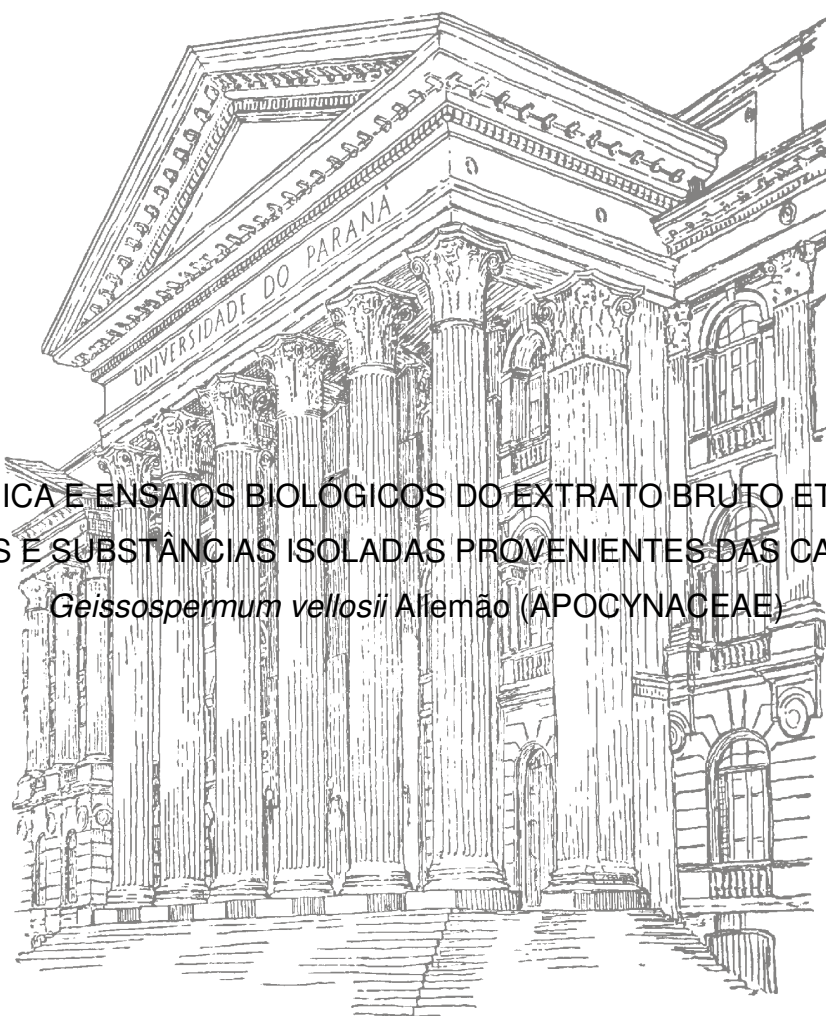


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS

FITOQUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO,
FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS PROVENIENTES DAS CASCAS DE
Geissospermum vellosii Allemão (APOCYNACEAE)



CURITIBA

2012

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS

FITOQUÍMICA E ENSAIOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO,
FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS PROVENIENTES DAS CASCAS DE
Geissospermum vellosii Allemão (APOCYNACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientador: Dr. Paulo Roberto Wunder

CURITIBA

2012

Dias, Josiane de Fátima Gaspari

Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão, (APOCYNACEAE) / Josiane de Fátima Gaspari Dias – Curitiba, 2012.

135 f.: il. ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientador: Professor Dr. Paulo Roberto Wunder

Tese (doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Área de Concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Inclui bibliografia

1. Produtos naturais. 2. Fitoquímica. 3. Medicamentos.
4. Plantas medicinais. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Wunder, Paulo Roberto. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS

Título: **Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão, (APOCYNACEAE)**

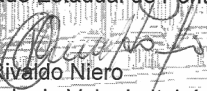
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Prof. Dr. Odulio Gomes Miguel
Orientador


Profª. Drª. Ana Luisa Lacava Lordello
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof. Dr. Rivaldo Niero
Universidade do Vale do Itajaí

Curitiba, 25 de maio de 2012.

Ao meu marido Sérgio e a minha amada filha
Luisa, por todo o amor, paciência e
dedicação.

Aos meus pais e avós, por todo o amor,
oportunidade e incentivo.

À Deus, pela saúde, força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, à Chefia do Departamento de Farmácia e à Coordenação do Curso de Farmácia.

Ao Dr. Obdúlio Gomes Miguel e ao Dr. Paulo Roberto Wunder, pela orientação, dedicação e paciência.

Ao Botânico Dr. Gert Hatschbach e ao Biólogo Osmar dos Santos Ribas, pelas informações da espécie vegetal.

À Fundação Araucária pelo suporte financeiro e à empresa As Ervam Curam pela doação do material vegetal.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.

Em especial às amigas Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel, Prof^a. Dr^a. Sandra Maria Warumby Zannin, Prof^a. MSc. Camila Klocker Costa e MSc. Gislene Mari Fujiwara e ao amigo Pedro Zannin, pelas horas de descontração, pelos conselhos e pelo ombro amigo.

Ao Departamento de Química da UFPR, em especial à Prof^a. Dr^a. Ana Luisa Lacava Lordello pelas análises de RMN e à Grazielli da Rocha pelas análises de rotação específica.

Ao MSc. Ranieri Campos, MSc. Cristina Mayumi Miyazaki, doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, e à Dr^a. Ivânia T. Schuckel da UEM, pelas análises de RMN.

À Dr^a Laura Cogo, Ângela Souza, Dr^a Cláudia Alexandra de Andrade, MSc. Cristina Peitz de Lima, MSc. Cristiane Bezerra da Silva, MSc. Ranieri Campos, Dr. João Luiz de Souza Carvalho, Luciana Marson dos Santos, Rafaele C.V. Sens, Suellen Christina Chaves, Fernando Lorini, Adriana Pesci Freitas e Geni Peruzzo, pelo auxílio nos ensaios realizados e carinho prestado.

Aos amigos e colegas Dr. Vitor Alberto Kerber, Dr^a Silvana Krychak-Furtado, Dr. Michel Otuki, MSc. Beatriz Hirota, MSc. Cristiane da Silva Paula, MSc.

Maria Christina Verdam, MSc. Milena Kalegari, MSc. Vanessa Cantelli, MSc. Vinícius Oliveira, MSc. Débora Borsato, Luciane Dalarmi, Paulo Sergio Diniz, que de diversas formas contribuíram para este trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Farmácia da UFPR.

Aos amigos e colegas do Hospital Geral de Curitiba, pelo incentivo e carinho.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico e biológico do extrato etanólico, frações e constituintes isolados provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae). O extrato etanólico foi fracionado obtendo-se as frações diclorometano, acetato de etila, butanol e hidroalcóolica remanescente. A fração diclorometano foi submetida à cromatografia em coluna e foram isolados os constituintes (1), (3), F12 e F14. A substância (2) foi obtida após a purificação da F12 por CLAE semi-preparativa. A substância (1) foi identificada como lupeol, a (2) como (+)-sesamina, a (3) como (+)-aspidospermina e a F14 como a mistura de sesamina e aspidospermina. O extrato etanólico e frações foram submetidos à atividade alelopática por meio de caixa de poliestireno e placa de Petri; a amostra F12 e aspidospermina por meio de caixa de poliestireno e cromatoplaca; e o lupeol por meio de cromatoplaca. As amostras testadas nos ensaios alelopáticos apresentaram vários resultados sobre *Triticum aestivum* L. e *Lactuca sativa* L. Os resultados demonstraram o potencial fitotóxico em mono e dicotiledôneas com influência na germinação, crescimento, respiração, teor de clorofila, atividade enzimática, índice mitótico e capacidade de recuperação. A atividade antibacteriana do extrato etanólico, frações, F12 e aspidospermina foi realizada por meio de disco difusão e MIC; e da fração diclorometano, aspidospermina e F12 por meio de bioautografia. No ensaio de disco difusão não foi verificada a inibição das bactérias testadas. No ensaio de CIM verificou-se que o extrato etanólico e a fração butanol inibiram o crescimento de *S. aureus*. No ensaio bioautográfico a fração diclorometano inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. typhimurium*, e a aspidospermina inibiu o crescimento de *S. epidermidis* e *S. typhimurium*. A atividade antioxidante da aspidospermina e da fração diclorometano foi investigada. No ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio a aspidospermina apresentou uma capacidade antioxidante superior a rutina e inferior ao ácido ascórbico; pelo método do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas apresentou atividade semelhante ao BHT na concentração de 1000 e 100 ppm, e ao ácido ascórbico na concentração de 500 e 100 ppm. Na verificação do potencial antioxidante pela atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase, as enzimas tiveram suas atividades influenciadas pela aspidospermina e fração diclorometano. O extrato etanólico, frações, F12 e aspidospermina frente a *A. salina* apresentaram resultados menores que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicativo de toxicidade. A aspidospermina, sesamina e F14 apresentaram imunomodulação, sendo capazes de estimular os neutrófilos humanos promovendo a liberação de complexos de oxigênio.

Palavras-chave: Alelopatia. Antibacteriana. Antioxidante. *Artemia*. Aspidospermina. Imunologia. Lupeol. Sesamina.

ABSTRACT

This work aimed to carry out the phytochemical and biological study of ethanolic extract, fractions and isolated compounds of barks from *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae). The ethanolic extract was partitioned resulting in dichloromethane, ethyl acetate, butanol and remaining hydroethanol fractions. The dichloromethane fraction was submitted to column chromatography and the compounds (1), (3), F12 and F14 were isolated. The substance (2) was obtained after F12 purification by the semi-preparative HPLC. The (1) was identified as lupeol, (2) as (+)-sesamin, (3) as (+)-aspidospermine, and F14 as sesamin and aspodospermine mixture. The ethanolic extract and fractions were submitted in allelopathic activity by way of polystyrene box and Petri plate; the F12 sample and aspodospermine by way of polystyrene box and TLC plate; and the lupeol by way of TLC plate. The samples tested in allelopathy bioassays showed several results on *Triticum aestivum* L. and *Lactuca sativa* L. These results demonstrate the phytotoxic potential against monocotyledons and dicotyledons affecting germination, growth, cellular respiration, chlorophyll content, enzymatic activity, mitotic index and recovery capacity. The antibacterial activity of ethanolic extract, F12 and aspodospermine were verified by way of disk diffusion and MIC; and dichloromethane fraction, F12 and aspodospermine by way of bioautography. However, it was not checked inhibition bacterial on the disk diffusion bioassay. The ethanolic extract and butanol fraction inhibited the *S. aureus* growth on the MIC bioassay. Dichloromethane fraction inhibited the *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* and *S. typhimurium* growth, and aspodospermine inhibited the *S. epidermidis* e *S. typhimurium* growth on the bioautographic bioassay. The antioxidant activity of aspodospermine and dichloromethane fraction were investigated. The aspodospermine presented a antioxidant capacity higher than rutin, and lower than ascorbic acid on the antioxidant activity by phosphomolybdenum method; by thiobarbituric acid reactive species method, the aspodospermine presented a similar activity as the BHT in a 1000 and 100 ppm concentration, and as ascorbic acid in 500 and 100 ppm concentration. The catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes had their activities influenced by aspodospermine and dichloromethane fraction on the antioxidant potential verification. The ethanolic extract, fractions, F12 and aspodospermine tested against *A. salina* showed results lower than $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ which indicative a degree of toxicity. The aspodospermine, sesamine and F14 showed immunomodulation, were able to stimulate human neutrophils by releasing of oxygen complexes.

Key words: Allelopathy. Antibacterial. Antioxidante. *Artemia*. Aspodospermine. Immunology. Lupeol. Sesamin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ESTRUTURAS MOLECULARES DE ALCALOIDES ISOLADOS DE <i>R. bahiensis</i>	22
FIGURA 2 -	ESTRUTURAS MOLECULARES DE ALCALOIDES ISOLADOS DE <i>G. argenteum</i>	26
FIGURA 3 -	ESTRUTURAS MOLECULARES DE ALCALOIDES ISOLADOS DE <i>G. sericeum</i>	26
FIGURA 4 -	ASPECTO GERAL DO RAMO DE <i>G. vellosii</i>	28
FIGURA 5 -	FOTOGRAFIA DAS CASCAS DE <i>G. vellosii</i>	29
FIGURA 6 -	ESTRUTURAS MOLECULARES DE ALCALOIDES ISOLADOS DE <i>G. vellosii</i>	30
FIGURA 7 -	FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>G. vellosii</i>	32
FIGURA 8 -	DESENHO EXPERIMENTAL DE MATERIAL E MÉTODOS.....	33
FIGURA 9 -	ESTRUTURAS MOLECULARES DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO DE DICLOROMETANO DE <i>G. vellosii</i>	59
FIGURA 10 -	ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1).....	60
FIGURA 11 -	EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1) NAS REGIÕES DE 10 a 60 ppm (A) E DE 70 a 158 ppm (B).....	61
FIGURA 12 -	ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1).....	62
FIGURA 13 -	EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1) NAS REGIÕES DE 0,70 a 1,16 ppm (A) E DE 1,20 a 3,00 ppm (B).....	63
FIGURA 14 -	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1) NA REGIÃO DE 3,0 a 8,0 ppm.....	64
FIGURA 15 -	ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA (1).....	66
FIGURA 16 -	ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (2).....	67
FIGURA 17 -	ESPECTRO DE RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (2).....	68
FIGURA 18 -	ESPECTRO RMN 2D DE COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) DA SUBSTÂNCIA (2).....	69
FIGURA 19 -	ESPECTRO RMN 2D DE HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) DA SUBSTÂNCIA (2).....	70
FIGURA 20 -	EXPANSÃO DO ESPECTRO RMN 2D DE COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) DA SUBSTÂNCIA (2) NA REGIÃO DE 1,5 a 4,7 ppm.....	71
FIGURA 21 -	ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (3).....	72
FIGURA 22 -	ESPECTRO DE RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (3).....	73
FIGURA 23 -	EXPANSÃO DO ESPECTRO RMN 2D DE COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) DA SUBSTÂNCIA (3) NA REGIÃO DE 6,7 a 7,3 ppm.....	74
FIGURA 24 -	ESPECTRO RMN 2D DE HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) DA SUBSTÂNCIA (3).....	75
FIGURA 25 -	ESPECTRO DE DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA (3).....	76
FIGURA 26 -	ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA (3).....	78
FIGURA 27 -	ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DA AMOSTRA F14.....	79
FIGURA 28 -	ESPECTRO DE RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) DA AMOSTRA F14.....	80
FIGURA 29 -	ESPECTRO DE DEPT 135° DA AMOSTRA F14.....	81
FIGURA 30 -	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA A AMOSTRAS DE <i>G. vellosii</i> PELO ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT.....	86
FIGURA 31 -	GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> (1) E <i>T. aestivum</i> (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L^{-1} DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE <i>G. vellosii</i> . DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY...	89

FIGURA 32 - CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> (1) E <i>T. aestivum</i> (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L ⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE <i>G. vellosii</i> . DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.	90
FIGURA 33 - TEOR MÉDIO DE CLOROFILA TOTAL E RESPIRAÇÃO POTENCIAL DE <i>L. sativa</i> (1) E <i>T. aestivum</i> (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L ⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE <i>G. vellosii</i> . DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY..	92
FIGURA 34 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS PEROXIDASE, CATALASE, POLIFENOLOXIDASE E α -AMILASE DE <i>L. sativa</i> (1) E <i>T. aestivum</i> (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L ⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE <i>G. vellosii</i> . DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.....	95
FIGURA 35 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE, ASCORBATO PEROXIDASE E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE <i>L. sativa</i> (1) E <i>T. aestivum</i> (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L ⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE <i>G. vellosii</i> . DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.....	96
FIGURA 36 - ÍNDICE MITÓTICO RADICULAR (NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS, PRÓFASE E METÁFASE) DE <i>L. sativa</i> (1) E <i>T. aestivum</i> (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L ⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE <i>G. vellosii</i> . DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY...	100
FIGURA 37 - ÍNDICE MITÓTICO RADICULAR (ANÁFASE E TELÓFASE) DE <i>L. sativa</i> (1) E <i>T. aestivum</i> (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L ⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE <i>G. vellosii</i> . DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.....	101
FIGURA 38 - REVERSIBILIDADE DE <i>L. sativa</i> (1) E <i>T. aestivum</i> (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L ⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE <i>G. vellosii</i> . DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY...	102
FIGURA 39 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS A 0,8 MG DE (1), F12 E (3) PROVENIENTES DE <i>G. vellosii</i> PELO ENSAIO ALELOPATOGRAFICO. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT.....	104
FIGURA 40 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DA SUBSTÂNCIA (3) PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A RUTINA E ÁCIDO ASCÓRBICO.....	108
FIGURA 41 - NEUTRÓFILOS ATIVADOS COM 2,5 (A) – 5,0 (B) – 10,0 (C) E 15,0 (D) μ g mL ⁻¹ DE SUBSTÂNCIA (2).....	114
FIGURA 42 - NEUTRÓFILOS ATIVADOS COM 2,5 (A) – 5,0 (B) – 10,0 (C) E 15,0 (D) μ g mL ⁻¹ DE SUBSTÂNCIA (3).....	114
FIGURA 43 - NEUTRÓFILOS ATIVADOS COM 2,5 (A) – 5,0 (B) – 10,0 (C) E 15,0 (D) μ g mL ⁻¹ DE F14.....	115
FIGURA 44 - CONTROLES DA ATIVIDADE SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	115

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 -	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Geissospermum vellosii</i>	27
TABELA 1 -	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA CLAE SEMI-PREPARATIVA.....	36
TABELA 2 -	CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS IMPREGNADAS NOS DISCOS DE PAPEL E RESPECTIVO SOLVENTE DE DILUIÇÃO.....	46
TABELA 3 -	CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS NAS CROMATOPLACAS E FASE MÓVEL UTILIZADA.....	47
TABELA 4 -	CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE CIM.....	49
TABELA 5 -	CONCENTRAÇÕES DA SUBSTÂNCIA (3) NO ENSAIO ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	51
TABELA 6 -	COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E ^1H (200 MHz, 50 MHz, ppm, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1) COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA LUPEOL.....	65
TABELA 7 -	COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E ^1H (300 MHz, 75 MHz, ppm, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (2) COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA SESAMINA.....	70
TABELA 8 -	COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E ^1H (300 MHz, 75 MHz, ppm, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (3) COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA ASPIDOSPERMINA.....	77
TABELA 9 -	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO.....	82
TABELA 10 -	CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA AOS CONSTITUINTES ISOLADOS DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO.....	83
TABELA 11 -	CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DICLOROMETANO E ACETATO DE ETILA DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO.....	84
TABELA 12 -	CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA AS FRAÇÕES BUTANOL E HIDROALCOÓLICA DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO.....	85
TABELA 13 -	GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> E <i>T. aestivum</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI.....	88
TABELA 14 -	TEOR MÉDIO DE CLOROFILA TOTAL E RESPIRAÇÃO POTENCIAL DE <i>L. sativa</i> E <i>T. aestivum</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI.....	91
TABELA 15 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE <i>L. sativa</i> E <i>T. aestivum</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI.....	94
TABELA 16 -	ÍNDICE MITÓTICO RADICULAR DE <i>L. sativa</i> E <i>T. aestivum</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI.....	99
TABELA 17 -	REVERSIBILIDADE DE <i>L. sativa</i> E <i>T. aestivum</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>G. vellosii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI.....	103
TABELA 18 -	GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> EM ENSAIO ALELOPATOGRAFICO COM AMOSTRAS DE <i>G. vellosii</i>	104
TABELA 19 -	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE <i>G. vellosii</i>	107
TABELA 20 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO-ESPECIES REATIVAS.....	109
TABELA 21 -	ATIVIDADE DE AMOSTRAS DE <i>G. vellosii</i> SOBRE AS ENZIMAS CATALASE, PEROXIDASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	110
TABELA 22 -	BIOATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE <i>G. vellosii</i> NO ENSAIO COM <i>A. salina</i> ...	112
TABELA 23 -	ATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE <i>G. vellosii</i> SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABAP	2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ARE	Elementos de resposta a antioxidantes
ATCC	American Type Culture Collection
ΔA	Diferença de Absorbância
BHT	Butil-hidroxitolueno
t-BHQ	terc-butil-hidroquinona
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Controle água
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	Controle metanol
CNBT	Com NBT
COSY	Correlação homomolecular ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$)
DEPT	Experimento de ^{13}C utilizando transferência de polarização
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EB	Extrato Etanólico Bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>
F12	Constituinte F12
F14	Constituinte F14
FAE	Fração acetato de etila
FB	Fração butanol
FD e FDCM	Fração diclorometano
FHA	Fração hidroalcoólica
HMQC	Espectro de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) com transições múltiplo-quânticas
IA	Índice antioxidante
IVG	Índice de velocidade de germinação
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
®	Marca registrada
MDA	Malonaldeído
NBT	azul <i>p</i> -Nitrotetrazólio
NEG.	Negativo
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Salina tamponada com fosfatos
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
Pm	<i>Proteus mirabilis</i>
PMA	Acetato de forbol miristato
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze

Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Se	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SNBT	Sem NBT
SOD	Superóxido dismutase
St	<i>Salmonella typhimurium</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMS	Tetrametilsilano
TPA	<i>O-tetradeconoilforbol-13-acetato</i>
TSA	Meio de cultura <i>Tryptic Soy Tooltip Agar</i>
TSB	Meio de cultura <i>Tryptic Soy Broth</i>
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 FAMÍLIA APOCYNACEAE JUSS.	21
2.2 GÊNERO <i>Geissospermum</i> Allemão	25
2.3 ESPÉCIE <i>Geissospermum vellosii</i> Allemão	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	32
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES	34
3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO DE DICLOROMETANO	35
3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	37
3.4.1 Avaliação da atividade alelopática por meio de caixa de poliestireno	37
3.4.2 Avaliação da atividade alelopática por meio de placa de Petri	38
3.4.2.1 Germinação e crescimento	39
3.4.2.2 Teor de clorofila e respiração celular	40
3.4.2.3 Atividade enzimática	41
3.4.2.3.1 Atividade da peroxidase	41
3.4.2.3.2 Atividade da catalase	41
3.4.2.3.3 Atividade da polifenoloxidase	41
3.4.2.3.4 Atividade da α -amilase	42
3.4.2.3.5 Atividade da superóxido dismutase	42
3.4.2.3.6 Atividade da ascorbato peroxidase	42
3.4.2.3.7 Quantidade de proteínas totais	42
3.4.2.4 Índice mitótico radicular	43
3.4.2.5 Reversibilidade	43
3.4.3 Avaliação da atividade alelopática por meio de cromatoplaca	44
3.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	45
3.5.1 Disco difusão	45
3.5.2 Bioautografia para atividade antibacteriana	47
3.5.3 Concentração inibitória mínima	48
3.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	50
3.6.1 Ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio	50
3.6.2 Ensaio antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas (TBARS)	51
3.6.3 Potencial antioxidante pela atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase	52
3.6.3.1 Atividade da catalase	53
3.6.3.2 Atividade da peroxidase	53
3.6.3.3 Atividade da superóxido dismutase	54
3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	54
3.8 ATIVIDADE SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES	58
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO DE DICLOROMETANO	58

4.2.1 Identificação estrutural de (1).....	59
4.2.2 Identificação estrutural de (2).....	67
4.2.3 Identificação estrutural de (3).....	72
4.2.4 Identificação estrutural de F14.....	79
4.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	81
4.3.1 Avaliação da atividade alelopática por meio de caixa de poliestireno.....	82
4.3.2 Avaliação da atividade alelopática por meio de placa de Petri.....	86
4.3.2.1 Germinação e crescimento.....	86
4.3.2.2 Teor de clorofila e respiração celular.....	91
4.3.2.3 Atividade enzimática.....	92
4.3.2.4 Índice mitótico radicular.....	98
4.3.2.5 Reversibilidade.....	101
4.3.3 Avaliação da atividade alelopática por meio de cromatoplaça	103
4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	106
4.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	108
4.5.1 Ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio.....	108
4.5.2 Ensaio antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas (TBARS).....	109
4.5.3 Potencial antioxidante pela atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase.....	109
4.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	111
4.7 ATIVIDADE SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	113
5 CONCLUSÕES	118
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
REFERÊNCIAS	121
ANEXOS	133

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais representam uma grande parcela nas descobertas de novos medicamentos. Das substâncias anticancerígenas e anti-infecciosas, 60 a 75% foram originárias de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Do total de 520 novos medicamentos aprovados entre 1983 e 1994, 39% foram produtos naturais ou derivados destes (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006). Considerando que a química sintética é a base da indústria farmacêutica, como nos países ocidentais, 25% das moléculas-alvo foram isoladas originalmente de espécies vegetais (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Nosso país apresenta a maior biodiversidade do mundo. Entretanto, as limitações relativas aos produtos naturais, como fonte de novos fármacos, são muitas, como a presença de misturas biológicas de difícil separação e caracterização, a complexidade do processo de avaliação, além da falta de investimentos e recursos para as pesquisas nessa área (SIMÕES *et al.*, 2000).

A pesquisa científica de plantas medicinais empregadas na terapêutica possui caráter inter e multidisciplinar, sendo esse aspecto fundamental para o desenvolvimento de estudo mais elaborado e de maior rigor técnico-científico, com o intuito de atender as exigências da Legislação Brasileira, no que se refere ao desenvolvimento e registro de fitoterápicos. A descoberta e, por consequência, o uso de fitofármacos, abrange uma gama interdisciplinar de conhecimentos, especialmente a área da química e biologia, o que tem contribuído para o isolamento, purificação, identificação e modificações estruturais de moléculas com potencial farmacológico (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

A espécie *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae), conhecida como Pau-Pereira, tem seu uso popular em problemas digestivos, tontura e prisão de ventre (JÁCOME *et al.*, 2003), além da indicação como antimalárica, antipirética e tônica (MUÑOZ *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2009a). Dentre seus metabólitos secundários destacam-se os alcaloides (ALMEIDA *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2009a).

Entretanto, a literatura é restrita sobre outros metabólitos secundários e propriedades biológicas de *G. vellosii*.

Nesse sentido, considerando que os metabólitos secundários apresentam diversas propriedades biológicas e podem atuar, por exemplo, como antibióticos, antifúngicos, antivirais, na proteção das plantas contra patógenos e como antigerminativos ou tóxicos para outras espécies vegetais (FUMAGALI *et al.*, 2008), estudos adicionais para explorar o potencial terapêutico da espécie *G. vellosii* são necessários.

Dessa forma, este trabalho tem seu mérito científico e originalidade ao testar amostras obtidas das cascas de *G. vellosii* por meio de ensaios fitoquímicos e biológicos, com intuito de contribuir ao desenvolvimento de um novo medicamento oriundo dessa espécie vegetal.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico, alelopático, antibacteriano, antioxidante, em *Artemia salina* e em neutrófilos humanos do extrato etanólico, fração diclorometano, fração acetato de etila, fração butanol, fração hidroalcoólica e compostos isolados, provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato etanólico a partir das cascas de *G. vellosii* e realizar o fracionamento do mesmo por meio da partição líquido-líquido;
- Isolar os constituintes presentes na fração de diclorometano por meio de cromatografia em coluna;
- Identificar os constituintes isolados por meio de RMN de ^1H e ^{13}C , faixa de fusão, CG-MS e rotação específica;
- Submeter o extrato etanólico, fração diclorometano, fração acetato de etila, fração butanol, fração hidroalcoólica, F12 e substância **(3)** a atividade alelopática por meio de caixa de poliestireno;
- Submeter o extrato etanólico, fração diclorometano, fração acetato de etila, fração butanol e fração hidroalcoólica a atividade alelopática por meio de placa de Petri;
- Submeter F12 e substâncias **(1)** e **(3)** a atividade alelopática por meio de cromatoplaça;
- Verificar a atividade antibacteriana por meio de disco difusão do extrato etanólico, fração diclorometano, fração acetato de etila, fração butanol, fração hidroalcoólica, F12 e substância **(3)**;
- Verificar a atividade antibacteriana por meio de bioautografia da fração diclorometano, F12 e substância **(3)**;
- Verificar a atividade antibacteriana por meio de concentração inibitória mínima do extrato etanólico, fração diclorometano, fração acetato de etila, fração

butanol, fração hidroalcoólica, F12 e substância **(3)**;

- Verificar a atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio da substância **(3)**;
- Verificar a atividade antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico-especies reativas da substância **(3)**;
- Verificar o potencial antioxidante da fração diclorometano e da substância **(3)** pela atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase;
- Submeter o extrato etanólico, fração diclorometano, fração acetato de etila, fração butanol, fração hidroalcoólica, F12 e substância **(3)** a avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e
- Submeter as amostras F12, F14, e as substâncias **(2)** e **(3)** a atividade sobre neutrófilos humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA APOCYNACEAE JUSS.

A família Apocynaceae Juss. compreende cerca de 200 gêneros com mais de 2.000 espécies de distribuição predominantemente tropical e subtropical em todo o mundo (JOLY, 1998). Menos frequentes em regiões temperadas (PEREIRA *et al.*, 2007), possuem hábitos variados e podem ser espécies herbáceas, subarbustos, árvores e trepadeiras, das quais muitas produzem látex. Encontram-se nos campos e nas florestas (JOLY, 1998). Na flora brasileira, como apocináceas, têm-se catalogadas mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (PEREIRA *et al.*, 2007). Quimicamente, a família Apocynaceae caracteriza-se pela ocorrência frequente de estruturas alcaloídicas (PEREIRA *et al.*, 2007) e pode ser considerada uma das mais importantes fontes de compostos químicos úteis para a medicina (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Aproximadamente 300 diferentes alcaloides indólicos já foram isolados de 100 espécies dessa família (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Arndt *et al.* (1967) identificou vários alcaloides em espécies de apocináceas como: picralina, diacetilpicralina, carapanaubina e reserpilina de *Aspidosperma rigidum*; metoxidiidrocorinanteol de *Aspidosperma nitidum*; aricina, reserpilina, demetoxiaspidospermina e aspidocarpina de *Aspidosperma marcgravianum*; uleína, aparicina, dasicarpidona e estemadenina de *Aspidosperma pyricollum*; uleína e diidrouleína de *Aspidosperma nigricans*, e uleína e hidroxilacetilaspidospermatidina de *Aspidosperma tomentosum*.

Em 1975, Talapatra, Patra e Talapatra relataram o isolamento das substâncias coronaridina, voacristina, tabernaemontanina, dregamina, acetato de lupeol, acetato de α -amirina, lupeol, α -amirina e sitosterol, das folhas de *Tabernaemontana coronaria* R.Br. (TALAPATRA; PATRA; TALAPATRA, 1975).

Da espécie *Rhazya stricta* Decne., foi isolado o alcaloide tetraidrosecamina

diol com atividade anticancer *in vitro* (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1981). Foram isolados e identificados cerca de 100 alcaloides de diversas partes de *Rhazya stricta* (GILANI *et al.*, 2007). Desta espécie já foram relatadas as seguintes propriedades: sedativa, antidepressiva, hepatoprotetora, antimicrobiana, citotóxica, antineoplásica, anti-inflamatória, entre outras (GILANI *et al.*, 2007). Gilani *et al.* (2007) recomenda estudos alelopáticos de *R. stricta* devido a possibilidade desses alcaloides serem agentes aleloquímicos.

As espécies *Nerium oleander* L. e *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. já foram relatadas com propriedades alelopáticas sobre sementes de *Lactuca sativa* e *Bidens pilosa* (HOFFMANN *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2011),

Da *Aspidosperma pyriforme* Mart., Craveiro, Matos e Serur (1983) isolaram os alcaloides, aspidospermina e demetoxipirifolina, e Araújo Jr *et al.* (2007) isolou três alcaloides indólicos: aspidosfractinina, N-formilaspidofractinina e 15-demetoxipirifolina. Van Beek e Verpoorte (1984) identificaram a partir do extrato de folhas de *Tabernaemontana dichotoma* Roxb., dois alcaloides nomeados voafilina hidroxindolnina e hidroxidiidroaparicina.

Rates *et al.* (1988) identificou os alcaloides olivacina, coronaridina e tabersonina de *Peschiera australis* (Müll. Arg.) Miers. Mitaine *et al.* (1996) cita os alcaloides olivacina e guatambuína como substâncias antitumorais isoladas de *Aspidosperma olivaceum* Müll. Arg., *Aspidosperma australe* Müll. Arg. e *Aspidosperma longepetiolatum* Kuhlman.

Reis *et al.* (1996) isolou da *Aspidosperma ramiflorum* Müll. Arg., os alcaloides ramiflorina A e B.

Menzies *et al.* (1998) estudou a atividade de alcaloides isolados de *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand (akuamidina, akuamina, akuamicina, akuamigina e pseudoakuamigina) os quais demonstraram diferentes graus de afinidade, preferência e eficácia por receptores opióides. Mitaine e colaboradores comunicaram a presença dos alcaloides fendlerina, aspidoalbina e aspidolimidina em *Aspidosperma megalocarpon* Müll. Arg. (MITAINE *et al.*, 1998)

Carvalho *et al.* (2001) isolou ésteres 3 β -O-acil-lupeóis, os esteroides β -sistosterol, estigmasterol e β -sitosterona e os triterpenos β -amirina, α -amirina, lupeol e seus derivados acetilados da espécie *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke, conhecida popularmente como amapá e amapazeiro.

Da espécie *Tabernaemontana laeta* Mart., Medeiros *et al.* (2001) isolou os alcaloides metilvoachalotina, conodurina, voacamina, tabernamina, heineanina, coronaridina, voacangina; os tripterpenos α -amirina, β -amirina, lupeol, acetiltaraxasterol e o fitoesteroide β -sitosterol.

Treze alcaloides indólicos foram isolados de *Rauvolfia bahiensis* A. DC., sendo quatro destes isolados por Kato *et al.* (2002) e denominados 12-metoxi-N-metil-velosimina, demetoxipurpelina, 12-metoxiafinisina e 12-metoxi-velosimina (Figura 1).

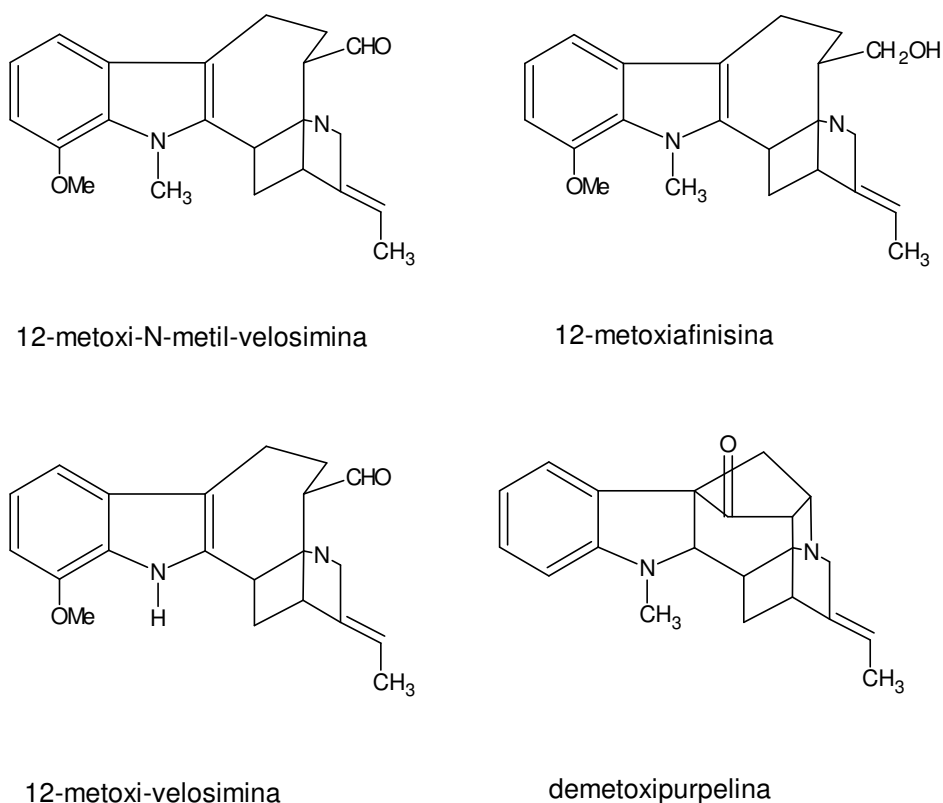


FIGURA 1 – ESTRUTURAS MOLECULARES DE ALCALOIDES ISOLADOS DE *R. bahiensis*
FONTE: KATO *et al.* (2002)

Os alcaloides quebracamina e aspidospermina, os quais funcionam como

bloqueadores adrenérgicos, foram isolados de *Aspidosperma auriculatum* Markgr. (BARBOSA *et al.*, 2003).

Jàcome *et al.* (2004) isolou da espécie *Aspidosperma parvifolium* A. DC. metiltetraidroelipiticina, uleína, epiuleína, aparicina, desmetiluleína, lupeol e estigmasterol.

Chaturvedula *et al.* (2002) testou o lupeol isolado de *Brachylaena ramiflora* (DC.) Humbert contra células de câncer ovariano A2780 e verificou uma fraca atividade citotóxica. Aratanechemuge *et al.* (2004) testou o lupeol sobre células leucêmicas HL – 60 e verificou que esta substância induz a apoptose resultando na supressão da proliferação dessas células. Ainda, há relatos que o lupeol possui as atividades anti-inflamatória (CHATURVEDI; BHUI; SHUKLA, 2008), ação inibitória *in vivo* contra *Plasmodium falciparum* (FACUNDO *et al.*, 2005) antiartrítica, antimutagênica, antioxidante e de quimioprevenção (CHATURVEDI; BHUI; SHUKLA, 2008).

Em 2004, Ferreira e colaboradores testaram o extrato clorofórmico básico da espécie *Aspidosperma ramiflorum* Müll. Arg. sobre promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* e verificaram que este extrato alcaloidal, o qual continha como constituintes majoritários os alcaloides ramiflorina A e B, foi mais efetivo sobre *L. amazonensis* (FERREIRA *et al.*, 2004). Posteriormente, em 2007, os alcaloides ramiflorina A e B foram testados sobre promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* corroborando com as pesquisas de Ferreira *et al.* (2004) ao verificar uma DL₅₀ de $16,3 \pm 1,6$ e $4,9 \pm 0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ramiflorina A e B, respectivamente (TANAKA *et al.*, 2007). Estes resultados mostraram-se promissores ao comparar com o resultado do medicamento utilizado na prática clínica, a pentamidina, a qual apresentou DL₅₀ de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TANAKA *et al.*, 2007).

Zocoler *et al.* (2005) identificou os alcaloides indólicos ibogamina, coronaridina, pseudoindoxil ibogaina, hidroxiindolenina voacangina, pseudoindoxil voacangina, tabernantina, catarantina, voacangina, oxovoacangina, hidroxicoronaridina, afinisina, afinina, voachalotina, ibogalina e conofaringina de

Tabernaemontana fuchsiaefolia A. DC.

Xavier de Araújo *et al.* (2007) isolou de *Aspidosperma pyriforme* os alcaloides aspidofractinina, 15-demetoxipirifolina e N-formilaspidofractinina.

A presença de sesamina em espécies da família Apocynaceae já foi relatada por Zhu *et al.* (2005) na espécie *Winchia calophylla* A. DC., da qual também já foi verificada a presença de alcaloides indólicos. Da sesamina há relatos de atividade antioxidante (NONAKA *et al.*, 1997; CHUNG *et al.*, 2010), anti-hipertensiva (KISO *et al.*, 2005; FACUNDO *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2010), antineoplásica (KISO *et al.*, 2005), citotóxica (HORI *et al.*, 2011), anti-inflamatória (CHUNG *et al.*, 2010) e de promoção da redução do colesterol (KISO *et al.*, 2005). Nascimento *et al.* (2003) testou a sesamina contra larvas de *Anticarsia gemmatilis* e verificou sua ação inseticida ao reduzir a viabilidade larval. Jayasinghe *et al.* (2003) demonstrou sua atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides*. Em testes contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (SIMONSEN *et al.*, 2004), *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* e *Plasmodium falciparum* (TUNTIWACHWUTTIKUL *et al.*, 2006), apresentou-se inativa. Chung *et al.* (2010) verificou que a sesamina estimula a angiogênese *in vitro* e *in vivo* podendo ser utilizada em tratamentos de doenças isquêmicas.

Figueiredo *et al.* (2010) identificou a partir de *Tabernaemontana salzmanii* A. DC., os alcaloides indólicos coronaridina, heineanina, voachalotina, voacangina, isovoacangina, isovoacristina, hidroxiiisovoavangina, olivacina e oxo-coronaridina. Destes alcaloides, a voacangina e isovoacangina demonstraram efetividade frente às células leucêmicas humanas da linhagem THP-1 maior que o medicamento sulfato de vincristina.

Das cascas da espécie *Aspidosperma Vargasii* A. DC. foram isolados os alcaloides elipticina e N-metiltetra-hidroelipticina e da espécie *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg., o alcaloide aspidocarpina (HENRIQUE; NUMOMURA; POHLIT, 2010).

2.2 GÊNÉRO *Geissospermum* Allemão

Este gênero é rico em alcaloides com núcleo indólico (PACCIONI; HUSSON, 1978), os quais, provavelmente agem nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (PEREIRA *et al.*, 2007). Com a apresentação destas características, os alcaloides indólicos são utilizados como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstritor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (PEREIRA *et al.*, 2007). Ainda, dos alcaloides indólicos, já foi relatada a atividade antitumoral, antimicrobiana, anti-hipertensiva, estimulante do sistema nervoso central e anticolinesterásica (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Da espécie *G. argenteum* Woodson, foram identificados por Paccioni e Husson (1978), quatro alcaloides do tipo aspidospermina: desmetoxiaspidospermina, aspidospermina, aspidoscarpina e desmetilaspidospermina (Figura 2).

Steele *et al.* (2002) identificou na espécie *G. sericeum* (Sagot) Benth. & Hook.f., três alcaloides indólicos (geissosquizolina, geissosquizolina-N-óxido e 1,2-de-hidro-geissosquizolina) e um alcaloide β -carbolina (flavopereirina) (Figura 3).

A atividade antimalárica das espécies *G. sericeum* e *G. argenteum* foi verificada pelas pesquisas de Steele *et al.* (2002) e Bertani *et al.* (2005), visto que o uso deste gênero na medicina popular contra malária é muito difundido na América do Sul, principalmente na Guiana Francesa.

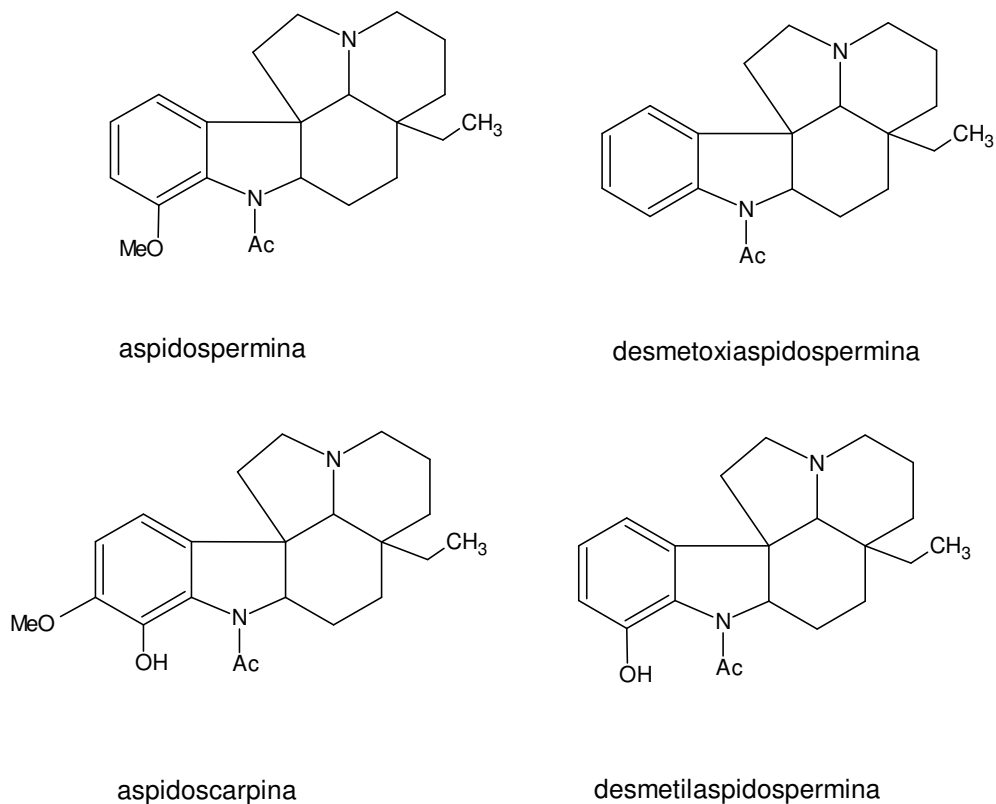


FIGURA 2 – ESTRUTURAS MOLECULARES DE ALCALOIDES ISOLADOS DE *G. argenteum*
 FONTE: PACCIONI e HUSSON (1978)

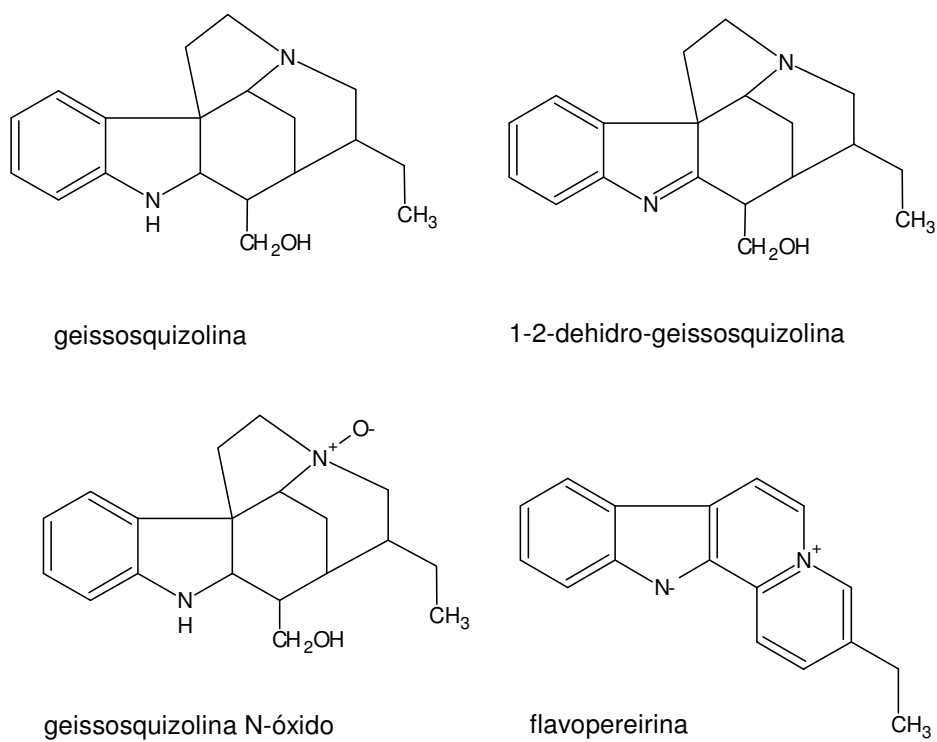


FIGURA 3 – ESTRUTURAS MOLECULARES DE ALCALOIDES ISOLADOS DE *G. sericeum*
 FONTE: STEELE *et al.* (2002)

2.3 ESPÉCIE *Geissospermum vellosii* Allemão

A espécie *Geissospermum vellosii* (Figura 4) apresenta o enquadramento taxonômico sugerido por dois autores, representado no quadro 1.

	SEGUNDO CRONQUIST (1981)	SEGUNDO ENGLER (JOLY, 1998)
DIVISÃO	MAGNOLIOPHYTA	ANGIOSPERMAE (ANTOPHYTA)
CLASSE	MAGNOLIOPSIDA	DICOTYLEDONEAE
SUBCLASSE	ASTERIDAE	SYMPETALAE
ORDEM	GENTIANALES	GENTIANALES
FAMÍLIA	APOCYNACEAE	APOCYNACEAE
GÊNERO	<i>Geissospermum</i>	<i>Geissospermum</i>
ESPÉCIE	<i>G. vellosii</i>	<i>G. vellosii</i>

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Geissospermum vellosii*

Espécie conhecida popularmente como Pau Pereira (MANSKE; HOLMES, 1952; ALMEIDA *et al.*, 2009), Camara-de-Bilro, Ubá-Açu, Pau-Forquilha, Canudo-Amargoso, Tringuaaba, Pau-Pente, Camara-do-Mato, Pinguaciba, Pereiro (CORRÊA, 1974), Pereiroá, Chapeú-de-sol (ALMEIDA *et al.*, 2009) e Maria Congo (BERTANI *et al.*, 2005). Cientificamente apresenta os sinônimos: *Geissospermum leave*, Miers, *Geissospermum vellozii*, Fr. Allem (INDEX KEWENSIS, 1895), *Tabernaemontana laevis* (INDEX KEWENSIS, 1913; MANSKE; HOLMES, 1952; CORRÊA, 1974) e *Geissospermum laevis*, Miers (CORRÊA, 1974).

Há relatos sobre a distribuição de *G. vellosii* nas regiões Norte (Amapá, Pará, Amazonas), Nordeste (Maranhão, Bahia), Centro-Oeste (Distrito Federal) e Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro) (KOCH; RAPINI, 2012).

O aspecto de *G. vellosii* assemelha-se com *G. sericeum*, portanto com o intuito de evitar tal confusão, Paris e Pointet (1954) realizaram exames micrográficos nas duas espécies e as diferenciaram, demonstrando que nas cascas de *G. vellosii*

as fibras esclerenquimáticas estão dispostas formando fileiras concêntricas, ao contrário da outra espécie.



FIGURA 4– ASPECTO GERAL DO RAMO DE *G.vellosii*
FONTE: GEISSOSPERMUM (2007)



FIGURA 5 – FOTOGRAFIA DAS CASCAS DE *G. vellosii*
FONTE: A AUTORA (2007)

Assim como outras espécies da família Apocynaceae, há relatos de substâncias alcaloídicas nas cascas (Figura 5) de *G. vellosii*: geissospermina, pereirina e velosina, sendo a geissospermina (Figura 6) encontrada em maior quantidade (MANSKE; HOLMES, 1952; RAPOPORT *et al.*, 1958).

Os alcaloides geissosquizolina (Figura 3), apogeissosquizina (Figura 6) e geissosquizina (Figura 6) foram obtidos por hidrólise ácida da geissospermina, isolada de *G. vellosii* (RAPOPORT *et al.*, 1958). A geissospermina foi estudada por Aurousseau (1960) e Aurousseau (1961), os quais observaram ação hipotensora e depressora do SNC, semelhante a uma substância psico-depressora do tipo tranquilizante, porém com baixa atividade. Estudos foram conduzidos com o intuito de verificar a ação da geissospermina no músculo esquelético, a qual apresentou ação relaxante, por ação em receptores nicotínicos (TANAE *et al.*, 1999; TANAE *et al.*, 2004).

Em 1962, Rapoport e Moore identificaram os alcaloides velosimina, velosiminol e geissolosimina (Figura 6) em *G. vellosii* e em 1973 os mesmos autores isolaram a substância geissovelina (Figura 6) (RAPOPORT; MOORE, 1962).

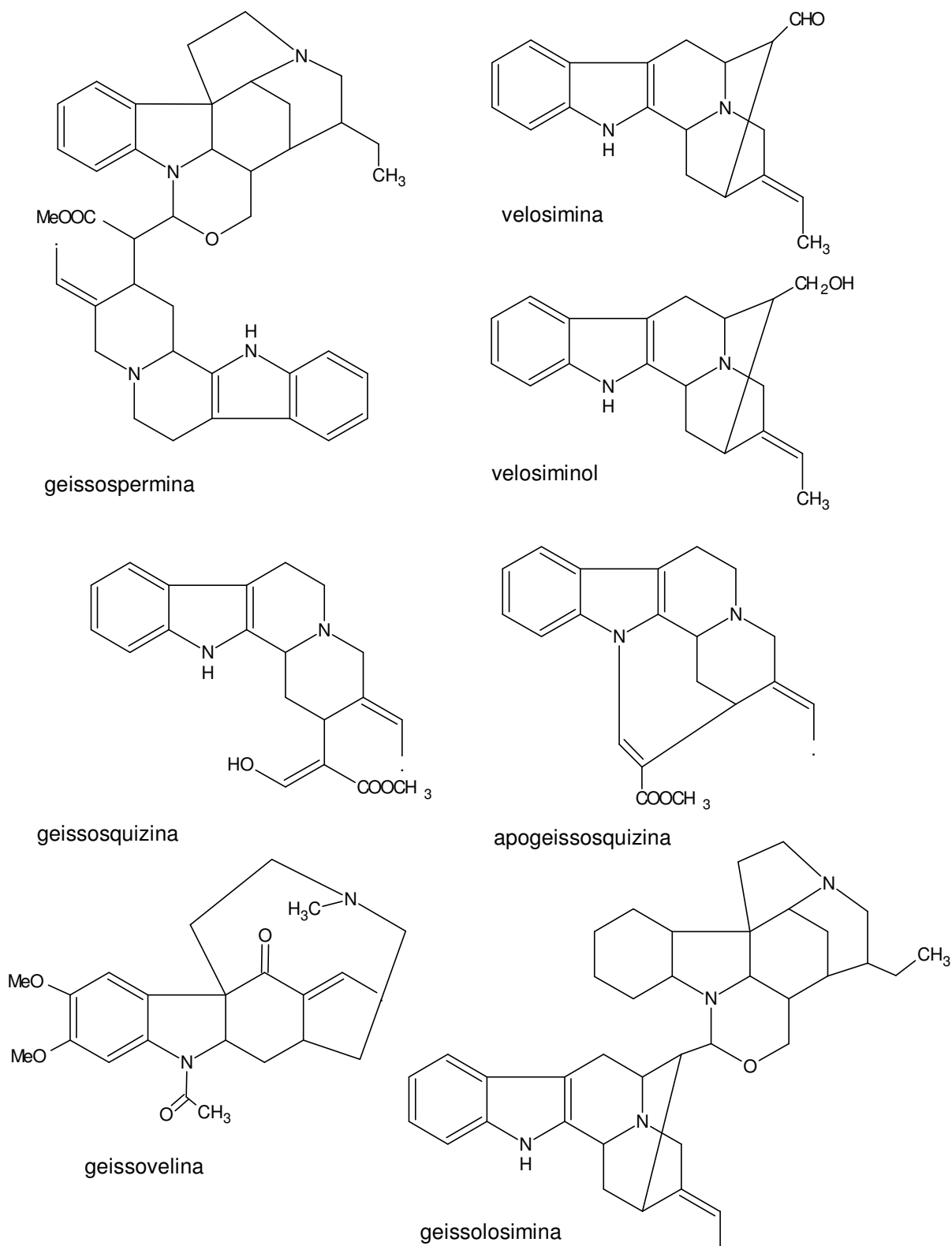


FIGURA 6 – ESTRUTURAS MOLECULARES DE ALCALOIDES ISOLADOS DE *G. vellosii*
 FONTE: PUISIEUX *et al.* (1959); RAPOPORT e MOORE (1962); MOORE e RAPOPORT (1973);
 CHIARONI e RICCHE (1979); ALMEIDA *et al.* (2009)

A flavopereirina (Figura 4) foi isolada das cascas de *G. vellosii* em 1958 por Hughes e Rapoport (HUGHES; RAPOPORT, 1958). Em 1982, Beljanski e Beljanski testaram a flavopereirina em células mamárias cancerosas e verificaram a inibição da síntese de DNA nestas células (BELJANSKI; BELJANSKI, 1982). Em 1993, Beljanski registrou uma patente nos Estados Unidos sob número 5,519,028 onde reivindicava um método para tratamento de pacientes infectados com HIV utilizando flavopereirina na forma de comprimido ou cápsula de administração oral (BELJANSKI, 1993). Em 1995, Fürstner e Ernst propuseram uma rota sintética para esta substância a partir do precursor 2-iodoanilina (FÜRSTNER; ERNST, 1995). Em 2000, Beljanski testou o PB-100, um composto derivado do alcaloide flavopereirina, em dezesseis diferentes linhagens de células malignas e verificou atividade anticancerígena ao destruir em média 90% destas células com a concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (BELJANSKI, 2000). Em 2004, Somel e Yamada verificaram a atividade antiplasmodial da flavopereirina contra *Plasmodium falciparum* (SOMEL; YAMADA, 2004).

Muñoz *et al.* (2000) testou o extrato hidroalcoólico (etanol-água 70-30%) das cascas do tronco de *G. laevis* em *Plasmodium vinckei* 279BY e *P. berghei* NK65, o qual apresentou atividade *in vitro* contra *P. vinckei*, foi inativo sobre *P. berghei*, e apresentou toxicidade de 100 mg kg^{-1} . Bertani *et al.* (2005) testou *in vitro* o extrato aquoso das cascas de *G. laevis* em *P. falciparum*, o qual foi inativo. Bertani *et al.* (2005) ressalta a importância da escolha do solvente ao comparar os resultados apresentados pelo extrato aquoso e etanólico.

Barros *et al.* (2006) estudou a captação de serotonina por alcaloides de *G. laevis*. Werner *et al.* (2009) verificou a ação antinociceptiva do extrato etanólico e fração de diclorometano de *G. vellosii* contra modelos químicos de nocicepção (ácido acético e formalina) e Lima *et al.* (2009a) verificou que a fração clorofórmio de *G. vellosii* possui potente atividade anticolinesterásica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As cascas de *Geissospermum vellosii* foram coletadas em novembro de 2002 no Nordeste brasileiro e gentilmente cedidas pela empresa As Ervas Curam Industria Farmacêutica Ltda.

O material vegetal foi identificado por comparação com exsicata registrada no Museu Botânico de Curitiba sob número 36060 (Figura 7) como *Geissospermum vellosii*.



FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *G. vellosii*

Após a obtenção do material vegetal (cascas de *G. vellosii*), o mesmo foi submetido a determinação da água pelo método gravimétrico da Farmacopéia Brasileira (2010).

Para facilitar o entendimento das técnicas utilizadas a partir da obtenção do material botânico, um esquema ilustrativo encontra-se na figura 8.

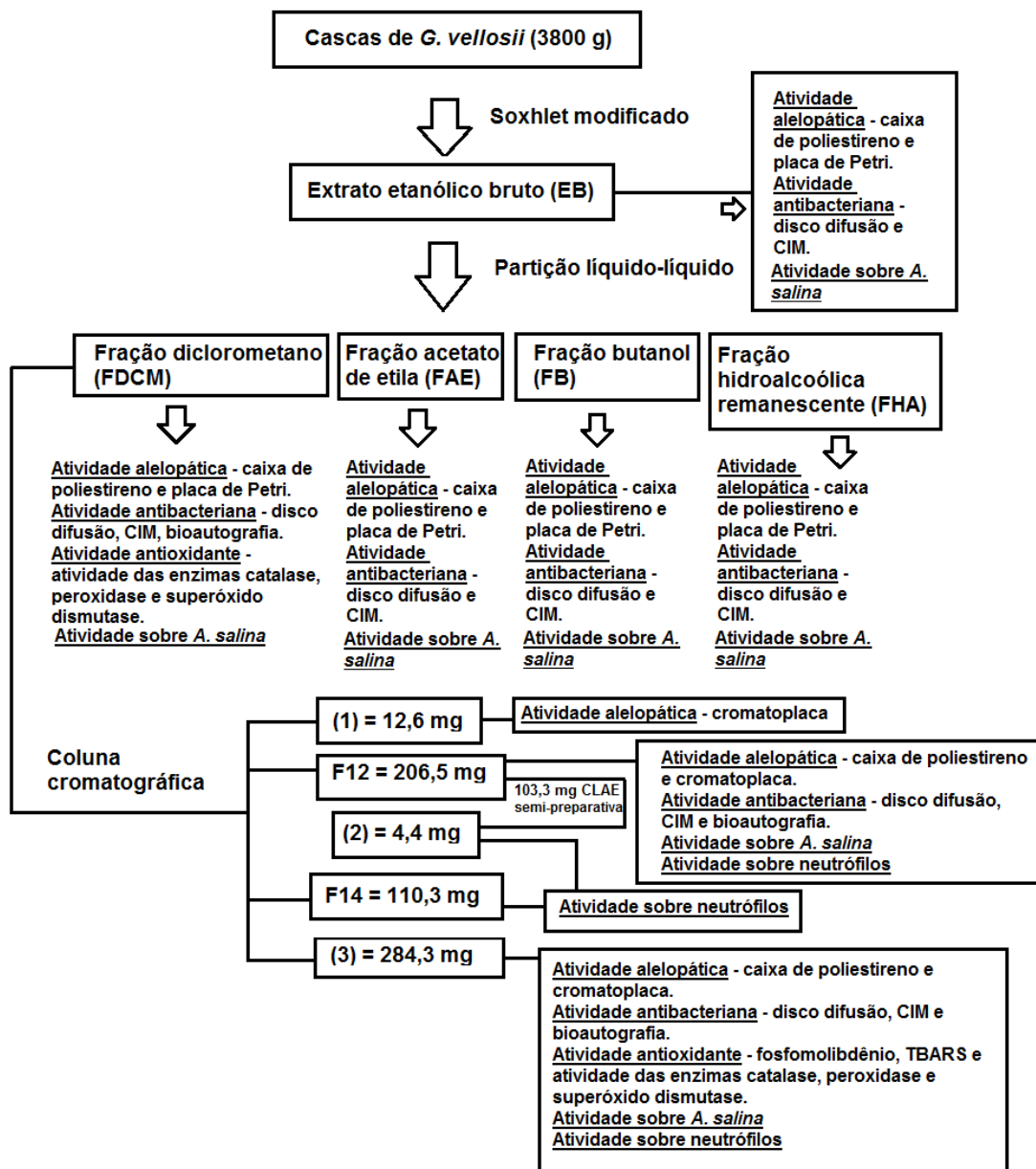


FIGURA 8 – DESENHO EXPERIMENTAL DE MATERIAL E MÉTODOS

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES

As cascas secas e trituradas (3800 g) de *G. vellosii* foram submetidas à extração em Soxhlet modificado (CARVALHO *et al.*, 2009), empregando etanol absoluto em quantidade suficiente, por aproximadamente 8 h. O extrato obtido foi filtrado com algodão e submetido à concentração em evaporador rotatório com pressão reduzida à temperatura de 50°C e 90 rpm até redução a 1/5 de seu volume inicial. Em seguida, o extrato etanólico foi colocado no freezer por 24 h e filtrado a vácuo em funil de Büchner. O resíduo seco do extrato etanólico foi determinado segundo a Farmacopéia Brasileira (2010).

Parte do extrato etanólico foi submetido a fracionamento com solventes de polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e butanol em extrator de Soxhlet modificado (CARVALHO *et al.*, 2009), obtendo-se as frações diclorometano (FDCM), acetato de etila (FAE), butanol (FB) e hidroalcoólica remanescente (FHA).

A FDCM e FAE foram submetidas à cromatografia em camada delgada utilizando as seguintes fases móveis e reveladores: **a.** acetato de etila e tolueno na proporção de 90:10 (v/v) com vapores de hidróxido de amônio e como revelador reagente de Dragendorff a 10% em ácido acético glacial (para nitrogenados); **b.** tolueno e acetato de etila na proporção de 93:7 (v/v) e como revelador uma solução de vanilina a 1% em etanol em partes iguais com ácido fosfórico 5% e aquecimento (para saponinas, glucosinolatos, esteróides e terpenos policíclicos); e **c.** acetato de etila, acetona, água e metanol na proporção de 15:8:2:2 (v/v) e como revelador o reativo de NEU a 1% em metanol (para fenólicos). A FB foi submetida à CCD utilizando fases móveis e reveladores **a** e **c**. Após a CCD da FDCM, FAE e FB, e do levantamento bibliográfico realizado, optou-se por submeter a FDCM a cromatografia em coluna.

3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO DE DICLOROMETANO

Parte da fração diclorometano (66,7570 g) foi acrescida de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) e levada à evaporação até secura (pastilha: fração + sílica). A pastilha da respectiva fração foi submetida a cromatografia por meio de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura com sílica gel 60 (70 - 230 mesh) basicificada com solução a 10% de bicarbonato de sódio (66,6417 g). Foram utilizados 100 mL de cada fase móvel, com uma vazão de 1 mL min^{-1} iniciando com hexano 100%, com acréscimo de 5% de diclorometano (95:05 - v/v), num gradiente de polaridade crescente, aumentando-se a proporção de diclorometano até 100% e acrescentando metanol na ordem de 10% até metanol 100%. Ao final, água destilada 100% foi acrescida para limpeza da coluna. Foram recolhidos 44 frascos com aproximadamente 50 mL de eluato.

Os frascos com eluato foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas Merck® 60 F₂₅₄ utilizando as fases móveis e reveladores **a** e **b**, citados no item 3.2.

A amostra do frasco F12 foi submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em condições semi-preparativas em aparelho Merck-Hitachi® composto de: bomba L2130 Elite LaChrom®; degaseificador de solventes L7812 Lachrom®; válvula de injeção Rheodyne® 7725i; detector DAD L2450 Elite LaChrom®; interface EZChrom Elite® conectada ao sistema operacional Windows® NT. Utilizou-se coluna Merck® ODS 5 μm (250 mm X 10 mm d.i.), à temperatura de 25°C e detecção por varredura de espectro de 200 nm a 400 nm. O gradiente foi utilizado conforme a Tabela 1, com injeções de 100 μL . Após as coletas, os eluatos foram reunidos, concentrados, neutralizados com hidróxido de amônio e extraídos com clorofórmio.

TABELA 1 - GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA CLAE SEMI-PREPARATIVA

Tempo (min)	Fase A (1 mg mL ⁻¹ de lauril sulfato de sódio dissolvido em solução 0,1 mol L ⁻¹ ácido fosfórico em ácido sulfúrico 0,01 mol L ⁻¹)	Fase B (metanol)	Fase C (acetonitrila: água 90:10)	Fluxo (mL min ⁻¹)
0 – 70	57%	30%	13%	1,2

Para identificação, os constituintes isolados foram submetidos à determinação da faixa de fusão, à determinação da rotação específica, quando necessária, à análise de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (uni- e bidimensionais) e CG-EM.

A faixa de fusão foi determinada em um bloco de Kofler adaptado a um microscópio. Os dados de rotação óptica foram obtidos em polarímetro P-2000 Jasco® Brasil a 20°C com lâmpada de sódio a 589 nm, com as amostras diluídas em clorofórmio.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C e experimentos bidimensionais dos constituintes **(2)** e **(3)**, foram realizados em espectrofotômetro Mercury® Plus Multinuclear operando a 300 MHz para o núcleo de ¹H e 75 MHz para o núcleo de ¹³C. Para análise de RMN dos constituintes **(1)** e F14, utilizou-se espectrofotômetro Bruker® AC 200 a 200 MHz para RMN de ¹H, e a 50 MHz para RMN de ¹³C. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao sinal do TMS (tetrametilsilano – (CH₃)₄Si) como referência em δ 0 ppm. O solvente utilizado nas espectroscopias de RMN de ¹³C e ¹H foi clorofórmio deuterado.

Para as análises de CG-EM utilizou-se o cromatógrafo gasoso Varian® 3300 equipado com coluna DB-225. Utilizou-se como gás de arraste hidrogênio a 6 mL por minuto, split a 6 mL por minuto (razão 1:1), purga do septo 3 mL por minuto, *make up* nitrogênio 25 mL por minuto e oxigênio a 100 mL por minuto. O gradiente de temperatura utilizado foi: temperatura inicial 100°C com patamar de 1 min e rampa de aquecimento a 8°C por min até 260°C com patamar de 6 min. A temperatura do injetor foi de 260°C e do detector de 280°C. O volume de injeção foi de 2 µL de uma solução 1mg mL⁻¹ em clorofórmio.

3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

3.4.1 Avaliação da atividade alelopática por meio de caixa de poliestireno

A metodologia seguiu o proposto por Dias *et al.* (2005) utilizando sementes de *Lactuca sativa* L. cv Babá de verão. As amostras utilizadas (EB, FDCM, FAE, FB, FHA, F12 e (3)) foram diluídas em soluções de concentrações decrescentes (0,8; 0,4; 0,2 e 0,1 mg) em 2 mL de metanol, em duplicata. Com o intuito de obter dissolução completa da amostra a ser analisada, escolheu-se metanol como solvente.

Papel de filtro (Whatman nº 6) recortado do tamanho das caixas de poliestireno cristal (quadradas com 11 cm e 3,5 cm de altura, contendo tampas e conhecidas como Gerbox[®], previamente tratadas com solução de hipoclorito de sódio 1% v/v e álcool etílico 77% v/v), foi embebido com as soluções preparadas com as devidas concentrações e colocado em estufa a 60°C por 24 h para total evaporação do solvente. Trabalhando-se em câmara de fluxo laminar, os papéis de filtro previamente secos e impregnados com as amostras foram colocados nas caixas e umedecidos com água destilada. A água destilada foi utilizada em quantidade segundo Krzyzanowski, Vieira e França Neto (1999), ou seja, de duas a três vezes o peso do papel. Após o preparo das caixas, 05 sementes de *Lactuca sativa* foram colocadas em cada caixa em quatro repetições, no total de 20 sementes por caixa. As caixas foram protegidas da luz com papel alumínio e colocadas em germinador com temperatura controlada de 20°C (BRASIL, 1992). Para cada concentração prepararam-se duas caixas, uma para estudo da germinação e outra para estudo do crescimento.

Como controle, foram preparadas caixas somente com água destilada e outras somente com metanol, sob as mesmas condições do ensaio. A utilização do metanol como controle teve como objetivo a posterior verificação da influência ou não do solvente empregado na diluição das amostras utilizadas.

Para o estudo da germinação, foram realizadas leituras diárias no mesmo horário, abrindo as caixas em fluxo laminar. As sementes que germinaram foram retiradas diariamente até o sétimo dia. As sementes foram consideradas germinadas conforme descrito por De Feo, De Simone e Senatore (2002) e Adegas, Voll e Prete (2003), ou seja, quando tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962) para cada repetição de cada tratamento (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999). O IVG foi calculado utilizando a quantidade de sementes germinadas, dividindo-a pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas à análise estatística.

A leitura do crescimento foi realizada apenas ao último dia de ensaio com abertura das caixas e retirada das plântulas uma a uma (com auxílio de uma pinça) medindo em papel milimetrado o comprimento da radícula e do hipocótilo. Os resultados das medições foram submetidos à análise estatística.

Para a análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). A diferença estatística entre os tratamentos foi determinada por meio do teste de Scott-Knott para múltiplas comparações e fixou-se $p < 0,05$ para indicar significância estatística. O tratamento foi considerado efetivo quando todas as repetições estiveram no mesmo grupo de médias. As médias obtidas pelo teste de Scott-Knott foram comparadas em porcentual em relação ao controle (SILVA, 2009).

3.4.2 Avaliação da atividade alelopática por meio de placa de Petri

Para a verificação da atividade alelopática por meio de placa de Petri foram utilizadas as amostras de EB, FAE, FDCM, FB e FHA em três concentrações (250, 500 e 1000 mg L⁻¹) sobre sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand rapids) e trigo (*Triticum aestivum* L. cv BRS 220).

A atividade alelopática foi verificada por meio de ensaios de germinação e

crescimento, teor de clorofila e respiração, atividade enzimática, índice mitótico radicular e recuperação (ou reversibilidade).

Para cada amostra avaliada, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos (controle água destilada, 250, 500 e 1000 mg L⁻¹), em quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade com auxílio do programa SigmaStat® (STATISTICAL ANALYSIS SOFTWARE, 2011). As médias obtidas foram calculadas em percentual em relação ao controle (SILVA, 2009).

3.4.2.1 Germinação e crescimento

A verificação da atividade alelopática foi realizada segundo técnica descrita na literatura (MACIAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000; BARNES *et al.*, 1987) com algumas modificações (BRASIL, 1992; SILVA, 2009). A germinação foi avaliada por meio do IVG (MAGUIRE, 1962) e porcentagem de germinação (LABOURIAU, 1983). O crescimento foi avaliado pela medição da radícula e do hipocótilo, e ao final do ensaio verificou-se a massa seca das plântulas.

As amostras utilizadas nos bioensaios foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN; ROMAGNI; DUKE, 2000), em concentrações de 1000, 500 e 250 mg L⁻¹, tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico) 10 mmol L⁻¹, e o pH ajustado para 6,0 (MACIAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000) com solução de KOH 0,1 mol L⁻¹, utilizando-se potenciômetro com eletrodo indicativo de pH. Como controle foi utilizado procedimento similar, porém na ausência do extrato ou fração.

Para avaliar a germinação, nas placas de Petri contendo papel filtro Whatman nº. 1 (esterilizados em autoclave), foram colocados 5,0 mL das amostras em teste (MACIAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000) e 50 sementes da espécie alvo (alface ou trigo), aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução

(BRASIL, 1992). As placas de Petri foram levadas a uma câmara de germinação, com umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constante (alface, 20°C com luz interna constante e trigo 15°C, no escuro), conforme Brasil (1992). A contagem para avaliar a germinação das espécies alvo foi realizada diariamente, de acordo com o item 3.4.1. Quando a germinação das espécies foi nula por três dias consecutivos, o experimento foi considerado concluído.

Para o crescimento radicular e do hipocótilo, utilizou-se procedimento similar ao descrito para avaliação da germinação. A leitura foi realizada após sete dias para *L. sativa* e oito para *T. aestivum*, e os alongamentos da radícula e do hipocótilo foram medidos com auxílio de papel milimetrado. Após as leituras as plântulas foram secas (40 plântulas após crescimento - quatro repetições de 10) em estufa 60°C até peso constante, para obtenção da massa seca.

3.4.2.2 Teor de clorofila e respiração celular

Para a determinação do teor de clorofila e respiração, as plântulas (40 plântulas após crescimento - quatro repetições de 10), foram divididas em partes aéreas e raízes (cortadas a 1 cm a partir da coifa). As partes aéreas foram utilizadas para determinação do teor de clorofila total segundo Arnon (1949); Cayon *et al.* (1990) e Carmo, Borges e Takaki (2007), e o resultado apresentado em teor médio de clorofila total (mg L^{-1}). A respiração potencial das células radiculares foi estimada por meio da redução do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) pela atividade de enzimas desidrogenase, envolvidas no processo de respiração, e do surgimento dos cristais de formazan. Para este ensaio utilizou-se técnica segundo Steponkus e Lanphear (1967) e Carmo, Borges e Takaki (2007). O resultado foi apresentado em absorbância a 530 nm.

As absorbâncias das soluções utilizadas nos ensaios citados anteriormente foram lidas em espectrofotômetro Shimadzu[®], modelo UV-1601.

3.4.2.3 Atividade enzimática

As amostras utilizadas nos testes de atividade enzimática foram preparadas a partir de material fresco (80 plântulas após crescimento - quatro repetições de 20), o qual foi macerado em gral com nitrogênio líquido. O pó resultante foi homogeneizado com 3 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0). O sobrenadante foi recolhido e utilizado como amostra (extrato enzimático) para as dosagens realizadas. As amostras foram acondicionadas a -18°C até o momento da análise. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601.

3.4.2.3.1 Atividade da peroxidase

Este ensaio foi realizado de acordo com Willadino *et al.* (2011). A atividade específica foi expressa em unidade enzimática, onde uma unidade é definida como a quantidade de enzima que aumenta 0,001 unidade de absorbância por minuto. O resultado foi apresentado como $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína solúvel.

3.4.2.3.2 Atividade da catalase

Este ensaio foi realizado de acordo com Singh *et al.* (2006), com modificações. O ensaio consistiu em uma mistura de reação contendo 3 mL de tampão fosfato de sódio e 100 μL do extrato enzimático. O decréscimo do H_2O_2 foi monitorado pela absorbância a 240 nm, por um período de 1 minuto. A atividade foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O resultado foi apresentado em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de material fresco.

3.4.2.3.3 Atividade da polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com Rappussi *et al.* (2009). Os resultados foram apresentados como atividade específica em unidade

de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.4.2.3.4 Atividade da α -amilase

Para a determinação da α -amilase, foi utilizada técnica segundo Neves e Moraes (2005) com modificações. Primeiramente, o extrato enzimático (0,4 mL) foi colocada em banho-maria a 70°C durante 20 min. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de tampão acetato de sódio (pH 7,0) e 1 mL da de solução de amido 1%, permanecendo incubados a 30°C por 5 minutos. Após, foi adicionado 0,5 mL de lugol e 1 mL de água. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm Os resultados foram apresentados em μg de amido hidrolizado $\text{min}^{-1} \text{g}$ de material fresco⁻¹.

3.4.2.3.5 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo Costa *et al.* (2005), com modificações. A mistura de reação consistiu de 100 μL de amostra e volume total de 3 mL. No ensaio, uma unidade superóxido dismutase foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e a atividade da enzima foi expressa em U mg^{-1} de proteína.

3.4.2.3.6 Atividade da ascorbato peroxidase

A determinação da atividade da ascorbato peroxidase foi realizada segundo Costa *et al.* (2005), com modificações. A mistura de reação consistiu de 100 μL de amostra e volume total de 3 mL. A atividade da ascorbato peroxidase foi expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.4.2.3.7 Quantidade de proteínas totais

A quantificação foi realizada segundo método adaptado de Bradford (1976) e Zeraik *et al.* (2008), com modificações. A curva analítica constituiu da diluição da albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 mg L⁻¹ e leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram apresentados em mg g⁻¹.

3.4.2.4 Índice mitótico radicular

Para determinação desse índice, foi empregada a metodologia de Pires *et al.* (2001), com algumas modificações. De cada plântula (40 plântulas após crescimento - quatro repetições de 10) foram coletados dois centímetros da raiz primária e imersas em fixador de Farmer durante 2 h a 25°C e, em seguida, transferidas para uma solução de álcool etílico 77 % (v/v) e armazenadas a 8°C. As pontas das raízes foram tratadas na seguinte ordem: água destilada por 5 min; ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ por 30 min a temperatura ambiente; água destilada por 5 min e azul de toluidina 2% por 2 min.

O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (intérfase + mitose) multiplicando-se por 100.

3.4.2.5 Reversibilidade

Para os ensaios de recuperação ou reversibilidade foram utilizadas as mesmas condições do bioensaio de crescimento conforme metodologia proposta por Gatti (2008) com algumas modificações. Após 48 h em presença das amostras em diferentes concentrações (1000, 500 e 250 mg L⁻¹) e controle, as plântulas foram transferidas e mantidas durante 5 dias para *L. sativa* e 6 dias para *T. aestivum*, em placas com água destilada. Após o período de sete e oito dias (de acordo com a espécie alvo) foi avaliado o comprimento da radícula, do hipocótilo, e o peso seco.

3.4.3 Avaliação da atividade alelopática por meio de cromatoplaça

Para este ensaio utilizaram-se as amostras **(1)**, F12 e **(3)**. Teve como objetivo pesquisar a atividade alelopática de amostras por meio da alelopatografia, a qual emprega cromatoplaças de sílica gel (DIAS, 2005).

A amostra a ser analisada (0,8 mg) foi diluída em solvente apropriado (50 µL de metanol para **(1)** e clorofórmio para as restantes) e distribuída uniformemente em 4 cm demarcados a partir de 1 cm de cromatoplaça com 5 cm de largura e 8 cm de comprimento. Após 6,5 cm de eluição da fase móvel (solução de acetato de etila e tolueno 90:10 (v/v), com vapores de hidróxido de amônio para F12 e **(3)**, e solução de tolueno e acetato de etila 93:7 (v/v) para **(1)**), as cromatoplaças foram visualizadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm), e o local da amostra foi demarcado. As cromatoplaças foram colocadas em estufa 60°C por 24 h. Duas cromatoplaças foram preparadas para cada amostra, uma destinada à avaliação da germinação e outra ao crescimento.

Cromatoplaças controle foram preparadas apenas com aplicação do solvente utilizado na diluição da amostra e eluição na mesma fase móvel com posterior envio a estufa, sob as mesmas condições do ensaio. Após as 24 h de estufa, as cromatoplaças foram retiradas e trabalhando-se em fluxo laminar, colocadas em Gerbox[®] (com papel de filtro Whatman nº 6). Após umedecimento com água destilada por vaporização, dez sementes de *L. sativa* cv Babá de verão foram acomodadas na região previamente demarcada.

As caixas Gerbox[®] envoltas em papel alumínio foram colocadas no germinador a 20°C. Para a análise da germinação e do crescimento procedeu-se conforme descrito anteriormente na avaliação da atividade alelopática por meio de caixa de poliestireno. Decorridos os sete dias de ensaio e as leituras de germinação e crescimento, as placas retornaram a estufa para secagem e posterior revelação com solução ácida de Dragendorff ou vanilina fosfórica com aquecimento.

Para análise estatística foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA,

2000). A diferença estatística entre os tratamentos foi determinada por meio do teste de Scott-Knott para múltiplas comparações e fixou-se $p < 0,05$ para indicar significância estatística.

3.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A susceptibilidade *in vitro* de cepas de diferentes microrganismos frente a concentrações de EB, FDCM, FAE, FB, FHA, F12 e **(3)** de *G. vellosii* foi investigada. Para a escolha dos microrganismos considerou-se a facilidade e rapidez de crescimento destes em meios de rotina (ROMEIRO, 2001), a significância clínica, e a disponibilidade.

3.5.1 Disco difusão

Este estudo utilizou técnica adaptada de Koneman *et al.* (1993), Romeiro (2001) e Carvalho *et al.* (2002), a qual baseia-se na inoculação de um microrganismo em meio de cultura específico, adição a este meio de discos de papel impregnados com amostras em estudo, difusão das amostras impregnadas nos discos no meio de cultura e incubação em temperatura favorável ao desenvolvimento do microrganismo em teste. A comprovação da atividade antibacteriana ocorre pela formação de halo de inibição ao redor do disco de papel impregnado com a amostra em estudo, e para atividade positiva, somente halos maiores que 8 mm foram considerados.

Cepas de *Escherichia coli* ATCC[®] 25022, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC[®] 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 6358 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®] 12228, foram utilizadas.

Como controle positivo de inibição utilizou-se cloranfenicol 30 µg. Discos impregnados com metanol e clorofórmio também foram utilizados para controle, pois a diluição das amostras em estudo foi realizada com esses solventes.

Primeiramente, em tubo de ensaio estéril, foram colocadas 600 e 2000 µg

(F12 e **(3)**) e 5000 e 10000 µg (EB, FDCM, FAE, FB, FHA) de amostras diluídas em 100 µL de metanol ou clorofórmio.

Em câmara de fluxo laminar, discos de papel (6 mm) foram colocados em placas de vidro estéreis e impregnados com 10 µL das amostras previamente preparadas (Tabela 2), metanol e clorofórmio. As placas contendo os discos foram fechadas e levadas à estufa 40°C por 24 horas.

TABELA 2 – CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS IMPREGNADAS NOS DISCOS DE PAPEL E RESPECTIVO SOLVENTE DE DILUIÇÃO

AMOSTRA	SOLVENTE DE DILUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO EM 10 µL
extrato etanólico	clorofórmio	500 e 1000 µg/ disco
fração diclorometano	clorofórmio	500 e 1000 µg/ disco
fração acetato de etila	metanol	500 e 1000 µg/ disco
fração butanol	metanol	500 e 1000 µg/ disco
fração hidroalcoólica	metanol	500 e 1000 µg/ disco
F12	clorofórmio	60 e 200 µg/ disco
(3)	clorofórmio	60 e 200 µg/ disco

As cepas dos microrganismos em teste foram repicadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas à 35°C, 24 h antes do teste. Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada bactéria foram diluídas em 5 mL de salina estéril comparando-se com a turbidez do tubo 0,5 da escala de Mac Farland. A inoculação foi realizada com auxílio de swab estéril em placa contendo meio de cultura ágar Mueller-Hinton. Este meio foi escolhido por ser um meio não enriquecido, porém suficientemente nutritivo para permitir o desenvolvimento das colônias bacterianas (KONEMAN *et al.*, 1993).

Para cada amostra testada procedeu-se da seguinte maneira: em cada placa inoculada, foram distribuídos discos de papéis impregnados com as amostras, um disco impregnado com solvente de diluição e um disco de controle positivo. As placas inoculadas foram colocadas em estufa a 35°C, durante 24 h. Após este período, as placas foram retiradas da estufa e medidos os halos de inibição, quando presentes, com auxílio de régua. O ensaio foi realizado em duplicata e os resultados apresentados em médias aritméticas.

3.5.2 Bioautografia para atividade antibacteriana

Para este ensaio utilizou-se técnica modificada de Romeiro (2001), o qual conceitua a bioautografia como conjunto de técnicas que englobam o uso de microrganismo para visualização e detecção de um composto ou o conjunto destes em determinado ambiente.

Para esta técnica foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC® 25022, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6358 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228.

Em câmara de fluxo laminar, foi aplicada amostra em cromatoplaça de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm), e a CCD foi realizada em fase móvel conforme a tabela 3. Após a eluição do solvente as placas foram secas em estufa 40°C por 30 min, para evaporação total dos solventes.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS NAS CROMATOPLACAS E FASE MÓVEL UTILIZADA

AMOSTRA	FASE MÓVEL	CONCENTRAÇÃO EM 10 µL
Fração diclorometano	acetato de etila 90: tolueno 10: dietilamina 3 (v/v)	1000 µg
F12	acetato de etila 90: tolueno 10: dietilamina 3 (v/v)	80 µg
(3)	acetato de etila 90: tolueno 10: dietilamina 3 (v/v)	80 µg

O inóculo bacteriano foi preparado repicando as cepas em ágar Mueller-Hinton e incubando-as a 35°C, 24 h antes do teste. Decorridas as 24 h, as culturas jovens de cada bactéria foram diluídas em 5 mL de salina estéril comparando-se com a turbidez do tubo 0,5 da escala de Mac Farland.

Em câmara de fluxo laminar, as placas secas de CCD foram colocadas em placas de vidro estéreis, as quais receberam o meio de cultura ágar Mueller-Hinton (mais ou menos 20 mL) com o inóculo bacteriano (para cada 100 mL do meio, utilizou-se 1 mL do inóculo). As placas foram incubadas por 24 h a 35°C e reveladas com TTC (cloreto de trifeniltetrazólio) a 1% em estufa 35°C por mais uma hora para verificação das zonas de inibição. O TTC foi utilizado por ser uma substância incolor

que, pelo metabolismo oxidativo, torna-se vermelha após sua redução. A presença de coloração vermelha foi interpretada como presença de microrganismo e prova negativa de efeito inibitório da amostra, enquanto que a ausência da coloração vermelha foi considerada como ausência de microrganismo e prova positiva para a inibição.

Como controle positivo de inibição do crescimento bacteriano utilizaram-se discos de cloranfenicol 30 µg e como controle negativo de inibição, placas de CCD eluídas somente com a fase móvel. Foi realizado também controle de esterilidade do meio e das placas, utilizando somente a placa de CCD com o meio sem o inóculo. O ensaio foi realizado em duplicata.

3.5.3 Concentração inibitória mínima

A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (2009).

Para esta avaliação foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25913; *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923; *Escherichia coli* ATCC® 25922; *Escherichia coli* ATCC® 35218; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853; *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212; *Enterococcus faecalis* ATCC® 5129 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603.

As linhagens de referência foram armazenadas a -80 °C em TSB (*Tryptic Soy Broth*) com glicerol a 15%, até o momento do uso. Para reativar estas linhagens, as mesmas foram subcultivadas em ágar TSA (*Tryptic Soy Tooltip Agar*), a temperatura de 37 °C por 20-24 h.

Para o preparo dos inóculos foram realizadas suspensões em tubo contendo salina estéril (NaCl a 0,85%) na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo

em forma de “U”, contendo 12 colunas e 8 linhas, identificadas de A a H. As amostras, preparadas na concentração de 4 mg mL^{-1} (EB) e 2 mg mL^{-1} (FDCM, FAE, FB, FHA, F12, **(3)**) diluídos em DMSO a 2% em água destilada, foram filtrados utilizando membrana milipore $0,22 \mu\text{m}$. Após a filtração foram preparadas soluções nas concentrações de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (EB) e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (FDCM, FAE, FB, FHA, F12, **(3)**). Em seguida foram transferidos $100 \mu\text{L}$ de caldo Mueller-Hinton na linha A das colunas 2 a 10. Na coluna 2 foram inoculados $100 \mu\text{L}$ de amostra e transferido após homogeneização $100 \mu\text{L}$ para o orifício da coluna 3, repetindo-se o procedimento até a coluna 10, e desprezando após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes das amostras testadas (Tabela 4).

Os inóculos bacterianos foram colocados em um volume de $5 \mu\text{L}$ nos orifícios das colunas de 2 a 10. Os orifícios das colunas 1, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento: a coluna 1 para o controle negativo ou de esterilidade, utilizando $100 \mu\text{L}$ de caldo Mueller-Hinton e $100 \mu\text{L}$ de amostra na concentração de 2000 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente; a coluna 11 para o controle negativo da atividade inibitória do diluente DMSO a 2%, utilizado na preparação das amostras, utilizando $100 \mu\text{L}$ de solução de DMSO a 2%, $100 \mu\text{L}$ de caldo Mueller-Hinton e $5 \mu\text{L}$ do inóculo bacteriano e a coluna 12 para controle positivo ou de viabilidade, receberam $100 \mu\text{L}$ de caldo Mueller-Hinton e $5 \mu\text{L}$ do inóculo bacteriano.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE CIM

COLUNA	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	EB	FDCM, FAE, FB, FHA, F12 E (3)
2	1000,00	200,00
3	500,00	100,00
4	250,00	50,00
5	125,00	25,00
6	62,50	12,50
7	31,25	6,25
8	15,62	3,12
9	7,81	1,56
10	3,90	0,78

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 16 a 20 h. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescentados $20 \mu\text{L}$ de solução aquosa

de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio) a 0,5% (AYRES *et al.*, 2008) e as microplacas foram reincubadas por 3 h a 35°C. Após esta incubação foi realizada a leitura dos resultados.

A presença de coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa de efeito inibitório da amostra, enquanto que a ausência da coloração vermelha foi considerada prova positiva de efeito inibitório da amostra. Cada teste foi realizado em duplicata.

3.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.6.1 Ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio

Para este ensaio utilizou-se metodologia adaptada de Prieto, Pineda e Aguilar (1999), a qual baseia-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V, pela amostra analisada, e obtenção de um complexo fosfato-molibdênio V, de coloração verde em pH ácido, o qual é determinado espectrometricamente a 695 nm.

A atividade antioxidante da substância **(3)** foi verificada e comparada aos padrões rutina e ácido ascórbico. A solução reagente do complexo fosfomolibdênio foi formada pela reação da solução de fosfato de sódio (28 mL, 0,1 mol L⁻¹), com a solução de molibdato de amônio (12 mL, 0,03 mol L⁻¹) e a solução de ácido sulfúrico (20 mL, 3 mol L⁻¹), em meio aquoso, com volume final ajustado para 100 mL com água destilada. A 3 mL desta solução reagente, adicionou-se a amostra em diferentes concentrações e metanol (Tabela 5) e 300 µL dos padrões rutina e ácido ascórbico diluídos a 200 µg mL⁻¹ em metanol. A mistura foi incubada por 90 min a 95°C. Após o resfriamento, procedeu-se à leitura das absorbâncias em espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601, utilizando a solução reagente como branco. O ensaio foi realizado em triplicata e a capacidade antioxidante total foi expressa como equivalentes de rutina e ácido ascórbico em porcentagem conforme a fórmula:

$$\% = \{[\text{Abs}_{(\text{amostra})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}] / [\text{Abs}_{(\text{Vit C. ou Rutina})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}] \times 100$$

TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES DA SUBSTÂNCIA (3) NO ENSAIO ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

QUANTIDADE DE (3) DILUÍDA A 200 µg mL ⁻¹ EM METANOL (µL)	CONCENTRAÇÃO DE (3) (µg)	QUANTIDADE DE METANOL ADICIONADO (µL)
300	60	-
250	50	50
200	40	100
150	30	150
100	20	200

3.6.2 Ensaio antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas (TBARS)

Este método, adaptado de Kishida *et al.* (1993) e Moraes *et al.* (2006), envolve a peroxidação da gema de ovo por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malonaldeído (MDA) é um dos principais produtos de decomposição dos hidroxiperoxídeos de ácidos graxos poliinsaturados, formado no decorrer do processo oxidativo (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005). Ao reagir o MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio acidificado e sob condições de elevada temperatura, pode-se mensurar a peroxidação lipídica de matrizes biológicas por meio do cromóforo róseo formado. Segundo Kishida *et al.* (1993), este é o ensaio mais comum para verificação da peroxidação lipídica.

A amostra (3) foi testada e como padrões positivos foram utilizados os antioxidantes BHT (Butil-hidroxitolueno) e ácido ascórbico nas mesmas quantidades. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo (10% p/v), 0,1 mL de amostra ou padrão (100, 500 e 1000 ppm) e completado o volume para 1 mL com água destilada. Em seguida, acrescentou-se a cada um dos tubos de ensaio, 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (ABAP) 0,07 mol L⁻¹, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5)

e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% (p/v) em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1,1% (p/v). Os tubos foram submetidos ao banho-maria 95°C por 1 hora, sob agitação. Após resfriamento, foi acrescentado a cada tubo 5 mL de *n*-butanol e estes foram centrifugados por 10 min a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram submetidos ao espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601 em 532 nm. O mesmo processo foi realizado com tubos controle que continham todos os reagentes exceto as amostras.

A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem, segundo a fórmula: $IA (\%) = 1 - (Abs_{amostra}/Abs_{controle}) \times 100$, onde, $Abs_{amostra}$ corresponde a absorbância da amostra e $Abs_{controle}$ a absorbância do controle totalmente oxidado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparações entre as médias dos índices de atividade (IA%), utilizou-se o teste de Tukey com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3.6.3 Potencial antioxidante pela atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase

Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar a atividade das amostras FDCM e (3) de *G. vellosii* sobre as enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase em matriz biológica, e comparar esta atividade à apresentada pelo acetato de tocoferol e ácido ascórbico. As amostras e os controles foram diluídos a 200 µg mL⁻¹ em tampão fosfato para utilização nos ensaios.

O acetato de tocoferol e o ácido ascórbico foram escolhidos como controles porque representam a primeira barreira aos radicais livres lipofílicos e hidrofílicos, respectivamente (CÓRDOVA; NAVAS, 2000). As amostras testadas e os controles foram diluídas em etanol, obtendo-se uma concentração de 200 µg mL⁻¹. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram

comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade com auxílio do programa SigmaStat® (STATISTICAL ANALYSIS SOFTWARE, 2011). Todas as análises foram realizadas em triplicata e as amostras foram submetidas ao espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601.

3.6.3.1 Atividade da catalase

Este ensaio foi realizado segundo Pietrzycka *et al.* (2006) com modificações, e baseia-se na diminuição do H_2O_2 . Foi adicionado 1,0 mL de amostra ou controle em tubos de ensaio, onde 0,1 mL de plasma de coelho liofilizado em solução de tampão fosfato a 2,0% foi adicionado e misturado com 1,0 mL de H_2O_2 . Imediatamente após a adição de H_2O_2 , os tubos foram encaminhados ao espectrofotômetro a 240 nm, sendo realizadas duas leituras: uma após a adição do H_2O_2 (A_0) e após 15 segundos (A_{15}). As reações foram realizadas a 25°C e a atividade da catalase (CAT) foi calculada por meio da equação:

$$U = 0,153 \times \frac{\log A_0}{\log A_{15}}$$

3.6.3.2 Atividade da peroxidase

Este ensaio foi realizado segundo Costa *et al.* (2005), com modificações. A quantidade de 500 μL de plasma de coelho liofilizado em solução a 2,0% em tampão fosfato, foi adicionado a 1,0 mL de amostra ou controle. Em seguida, cada amostra recebeu 100 mmol L^{-1} de tampão fosfato (pH 7,0), 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de EDTA, 5 mmol L^{-1} de guaiacol e 15 mmol L^{-1} de H_2O_2 no total de 3,0 mL de volume. A formação do tetraguaiacol, ou seja, a oxidação do guaiacol foi monitorada pela leitura da absorbância em 470 nm no momento da adição de H_2O_2 e um minuto após a adição. A diferença da absorbância foi dividida pelo coeficiente de extinção molar do guaiacol (26,6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) e a atividade da peroxidase foi expressa em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, considerando que 4,0 mol de H_2O_2 reduzido produz 1,0 mol

de tetraguaiacol.

3.6.3.3 Atividade da superóxido dismutase

Este ensaio foi realizado segundo Costa *et al.* (2005) e Pietrzycka *et al.* (2006), com modificações. A atividade da superóxido dismutase foi determinada por meio da habilidade da amostra em inibir a redução fotoquímica do NBT. Em 1,0 mL de amostra ou controle foram adicionados 1,0 mL de solução de sangue de carneiro a 2,0% em tampão fosfato, seguida de 1,0 mL de solução L-metionina (13 mmol L^{-1}) com NBT ($0,44 \text{ mmol L}^{-1}$) e de riboflavina (1 mmol L^{-1}) em tampão fosfato de potássio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0). A reação foi iniciada após a colocação dos tubos de ensaios sob duas lâmpadas fluorescentes de 15W cada, a 25°C. Após 15 min de reação os tubos foram retirados da fonte luminosa para que a reação fosse finalizada. Tubos de ensaios não iluminados (escuro) foram utilizados como controle. A absorbância foi medida a 560 nm em espectrofotômetro, sendo todas as análises realizadas em triplicata. A atividade foi calculada por meio da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Este ensaio foi realizado segundo Meyer *et al.* (1982) com algumas modificações. O estudo foi realizado com o EB, FDCM, FAE, FB, FHA, F12 e **(3)**. As amostras secas, em quantidade de 10 mg, receberam clorofórmio para obter a concentração inicial da solução de 10 mg mL^{-1} . Desta solução foram transferidos 5, 50 e 500 μL para tubos de ensaio e o solvente evaporado por 12 h (em banho-maria 40°C). O controle negativo consistiu de clorofórmio, o qual foi evaporado juntamente com as amostras e o controle positivo foi sulfato de quinidina nas mesmas concentrações das amostras em teste. Os resultados também foram comparados ao controle positivo dicromato de potássio que segundo Moreira *et al.* (2003),

apresentou DL_{50} na faixa de 20 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O ensaio foi realizado em triplicata.

A água foi preparada adicionando 38 g de sal marinho (23 g NaCl, 11 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4 g Na_2SO_4 , 1,3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g KCl) em 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9,0 com Na_2CO_3 para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo Lewan *et al.* (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado. Os ovos de *A. salina* (200 mg/ 400 mL) foram colocados na água salgada por 48 h sob aeração e luz contínua para eclodir. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9.

Após a eclosão dos ovos, foram transferidos 10 náuplios de *A. salina* para cada tubo de ensaio contendo as amostras e controles. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 5 mL, correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A contagem das larvas mortas e vivas foi realizada após 24 h, com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos (FINNEY, 1956) e determinados os valores de DL_{50} e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando a DL_{50} foi menor que 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MEYER *et al.*, 1982).

3.8 ATIVIDADE SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Este ensaio foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR dos projetos intitulados “Estudo químico dos alcaloides e seu efeito sobre a função dos neutrófilos humanos” e “Estudo de produtos naturais sobre a função dos neutrófilos humano” sob registro CEP/SD 603.140.08.8/ CAAE 2596.0.000.091-08 (Anexo 1) e CEP/SD 1033.158.10.11/ CAAE 0090.0.091.000-10 (Anexo 2).

Para a atividade sobre neutrófilos, as amostras F12, **(2)**, **(3)** e F14 foram testadas.

Para este ensaio utilizou-se técnica adaptada e modificada de Park, Fikrig e Smithwick (1968), Park e Good (1970), Levinsky *et al.* (1983), Markert, Andrews e Babior (1984) e Abreu *et al.* (2009). A quantidade de 1 mg de amostra foi solubilizada em 1 mL de DMSO, e a partir dessa concentração inicial foram preparadas as soluções 2,5 – 5,0 – 10,0 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em água destilada. Destas soluções, 50 μL foram adicionados em lâminas de vidro 48 h antes do ensaio e secas a temperatura ambiente. Para controle positivo utilizou-se 50 μL de PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) diluído a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em água destilada. Os controles negativos foram dois: o primeiro composto por neutrófilos humanos sem tratamento com o NBT (azul *p*-Nitrotetrazólio), e o segundo composto de neutrófilos humanos tratados com NBT. Este segundo controle negativo torna-se necessário para descartar a possibilidade de influência do NBT sobre a ativação dos neutrófilos.

O ensaio iniciou-se com a adição de 36 mL de água destilada e 3 mL de sangue humano (coletado no dia do ensaio com EDTA) em tubo cônico e homogeneização por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 12 mL de tampão PBS (salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) concentrado 4 vezes e homogeneizou-se novamente durante 15 segundos para depois centrifugar por 10 min a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se, delicadamente, o sedimento em 3 mL de PBS normal. Em um tubo cônico, contendo 3 mL de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade (Ficoll-Hypaque® densidade 1,076), o sedimento ressuspendido foi adicionado e centrifugado por 25 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspendido em 3 mL de PBS normal. Nova centrifugação foi realizada por 10 min a 2000 rpm e o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de PBS.

A suspensão de células em PBS foi adicionada nas lâminas previamente preparadas, e incubada a 37°C em câmara úmida por 20 min. Após incubação, as placas foram lavadas 10 vezes com PBS normal, adicionado 1 ou 2 gotas de corante NBT (3,2 mg mL^{-1} em PBS normal), com exceção da lâmina controle negativo sem NBT, e incubadas por 15 min a 37°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 5

vezes com PBS normal e secas à temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas foram coradas com safranina (preparada na proporção de 1:10 em água destilada a partir de uma solução etanólica a 2,5%, e filtrada por membrana milipore 0,22 µm), por 10 min, lavadas 3 vezes com água destilada e novamente secas à temperatura ambiente. Após o preparo, as lâminas foram examinadas ao microscópio, e a presença de grânulos azuis no interior de todos os neutrófilos foi considerada como ativação. A amostra foi considerada ativadora de neutrófilos somente após apresentar resultado positivo em cinco ensaios distintos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES

As cascas secas de *G. vellosii* apresentaram 9,6% de água. Este resultado está de acordo com os limites referenciados na Farmacopéia Brasileira (1988) que são de 8 a 14%.

Das cascas secas e trituradas (3800 g) foram obtidos 950 mL de extrato etanólico com 15,52 g% de resíduo sólido. Após a partição líquido-líquido, foram obtidas as frações de diclorometano (FDCM), de acetato de etila (FAE), de butanol (FB) e a hidroalcoólica remanescente (FHA).

As análises por CCD da FDCM, FAE e FB indicaram a presença de nitrogenados, saponinas, glucosinolatos, esteroides, terpenos policíclicos e fenólicos para a FDCM, e nitrogenados e fenólicos para a FAE e FB.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO DE DICLOROMETANO

Da FDCM submetida à cromatografia em sílica gel 60 (70 - 230 mesh) basicificada, foram separados os frascos 2, 12, 16 e 14. Do frasco 2 foi isolada a substância **(1)**, do frasco 12 a substância **(2)** e do frasco 16 a substância **(3)**, representados na Figura 9. Do frasco 14 foi isolada uma mistura constituída das substâncias **(2)** e **(3)**.

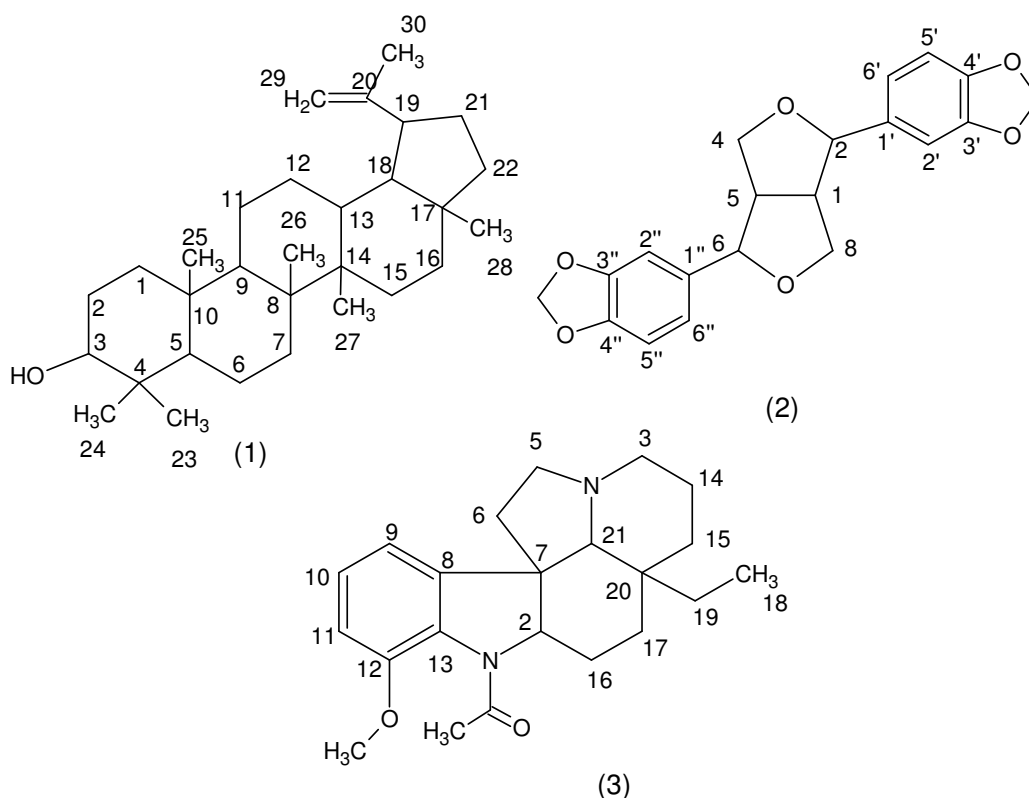


FIGURA 9 – ESTRUTURAS MOLECULARES DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE *G. vellosii*

4.2.1 Identificação estrutural de (1)

O frasco 2 da coluna cromatográfica da FDCM foi submetido a uma solução gelada de éter de petróleo, freezer e filtração em funil de vidro sinterizado. Foram obtidos 12,6 mg de sólido branco, denominado **(1)**. Esta substância representou 0,019% da FDCM e 0,0003% das cascas de *G. vellosii*. A faixa de fusão foi de 176 a 180°C, resultado próximo ao de Pinheiro *et al.* (2004), que foi de 178 a 180°C. A identificação da substância **(1)** foi realizada com base nos resultados obtidos por RMN de ¹H e ¹³C, CG-EM, faixa de fusão, e comparação desses com os encontrados na literatura.

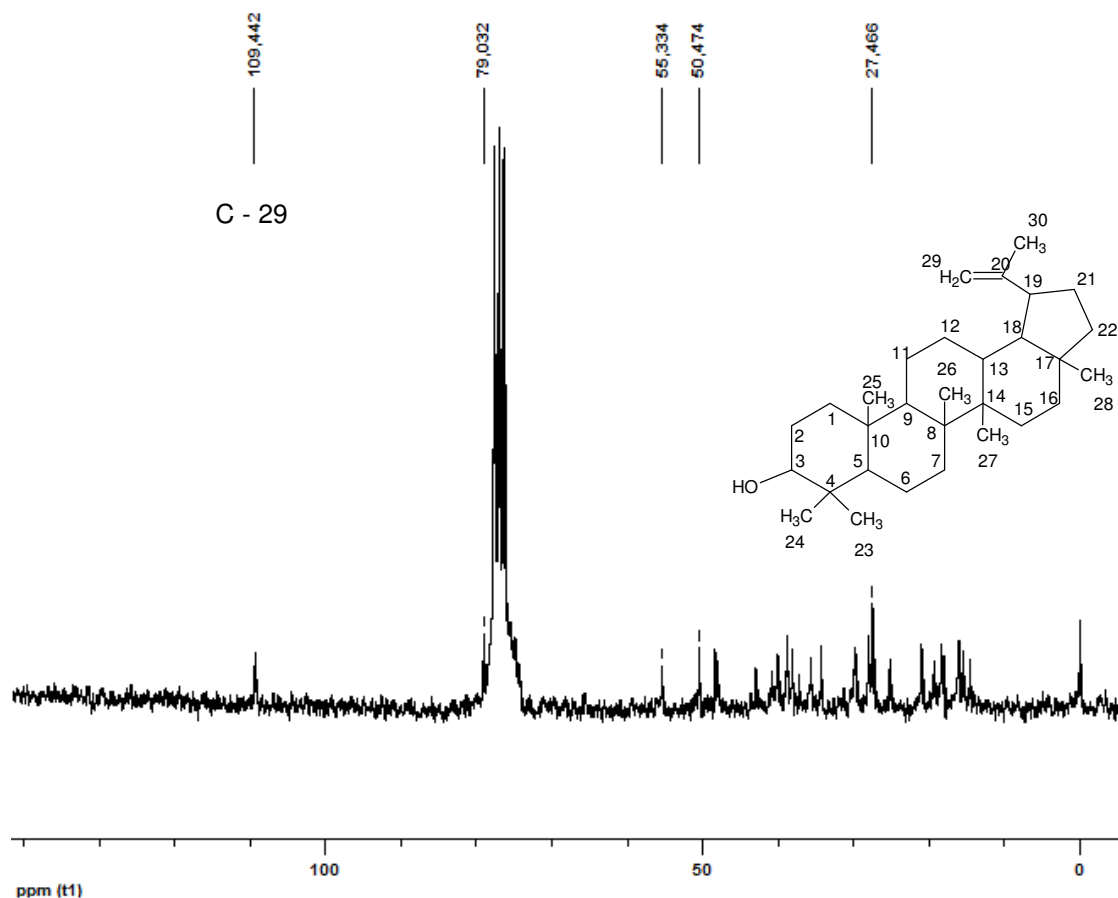


FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1)

Ao analisar os espectros de RMN de ^{13}C , foram verificados 30 carbonos (Figuras 10 e 11).

Os deslocamentos químicos em 150,9 ppm (C) e 109,3 ppm (CH_2), característicos de dupla exocíclica (C-20 e C-29) e o sinal em 79,0 (CH), os quais caracterizam um triterpeno com esqueleto lup-20 (29)-eno (Figuras 10 e 11), foram verificados.

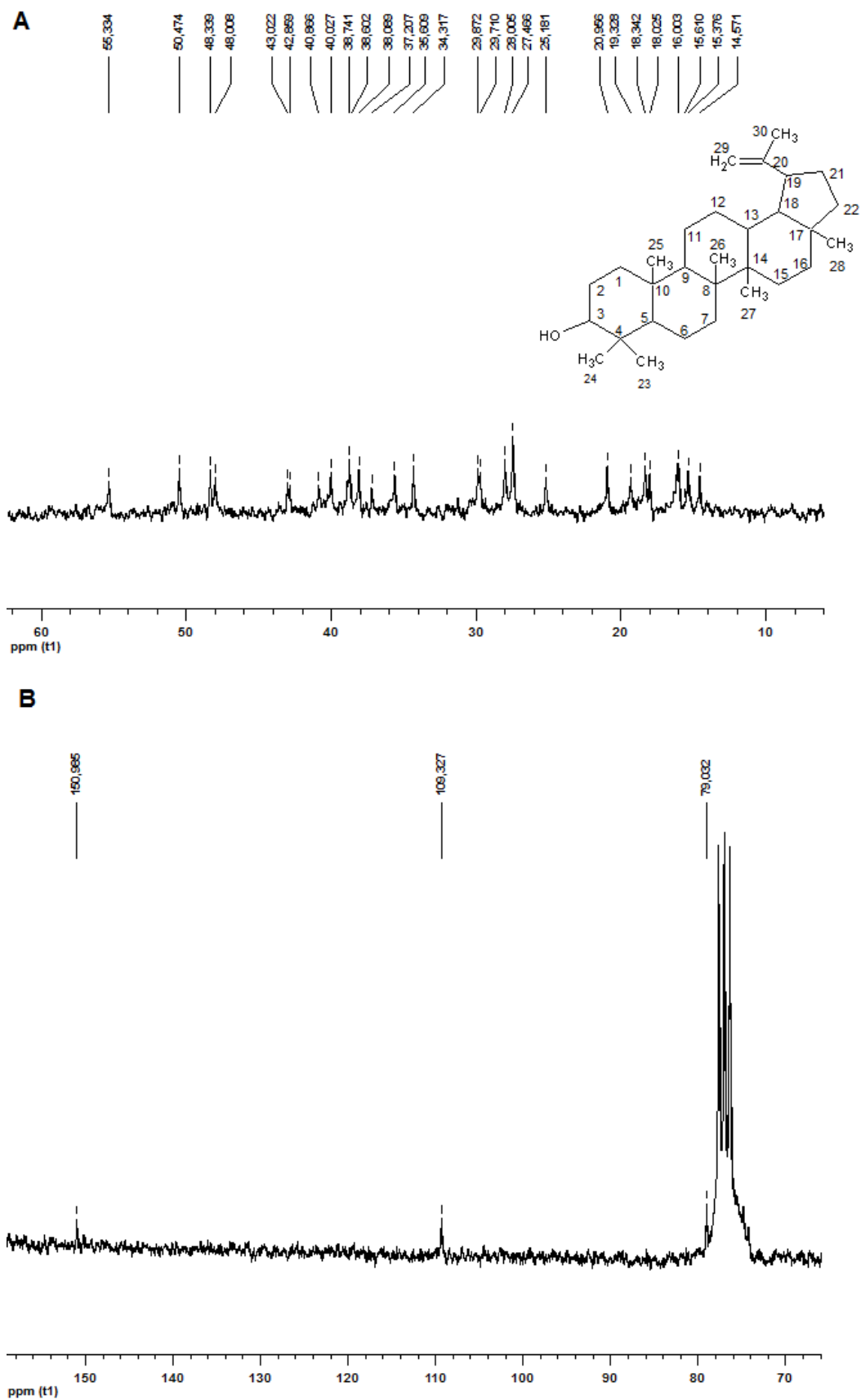


FIGURA 11 – EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (**1**) NAS REGIÕES DE 10 A 60 ppm (A) E DE 70 A 158 ppm (B)

Nos espectros de RMN de ^1H foram verificados os sinais em 4,68 e 4,57 ppm referentes aos hidrogênios vinílicos de dupla terminal (H-29); o sinal em 3,23 ppm referente ao hidrogênio carbinólico (H-3) indicando a presença da β -configuração, os singletos em 0,97, 0,76, 0,83, 1,03, 0,94 e 0,79 ppm referentes aos hidrogênios das metilas nas posições 23 a 28, e um singlete em 1,68 ppm referente aos hidrogênios da metila na posição 30, característicos para o lupeol (Figuras 12 a 14).

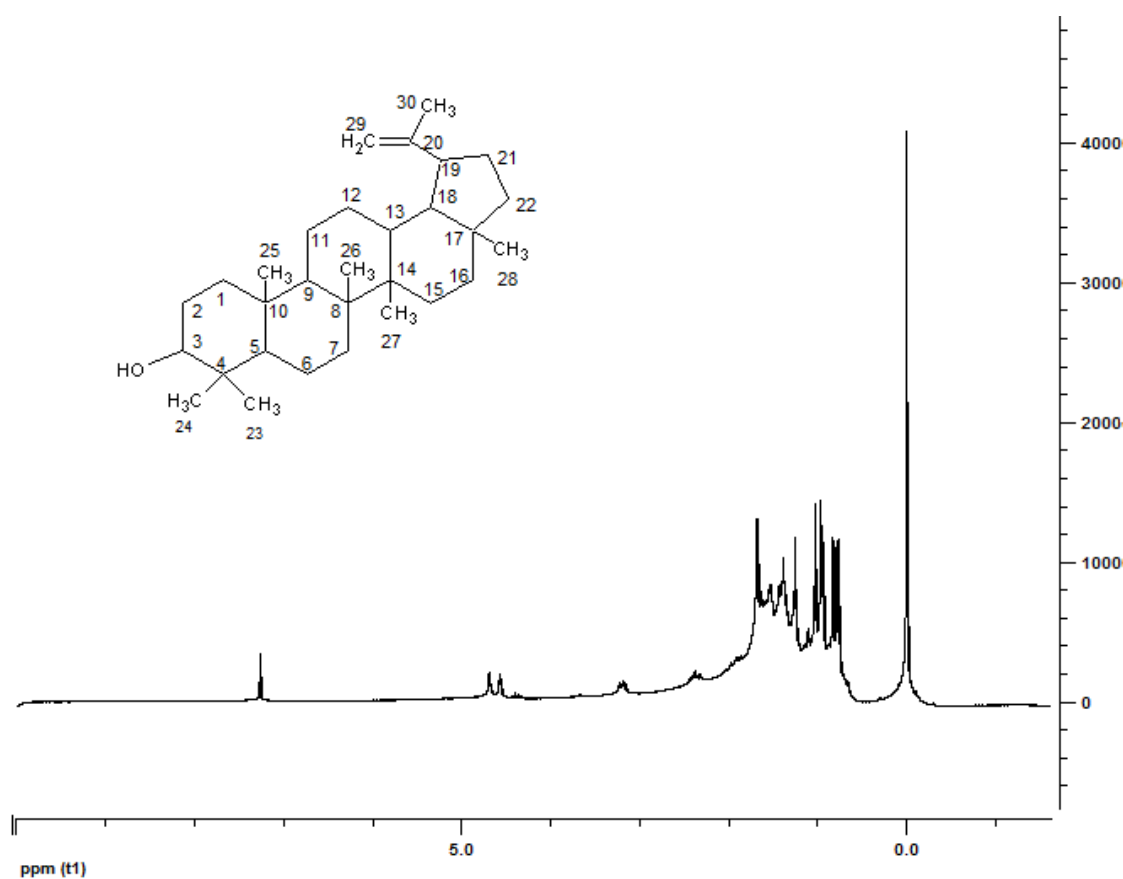


FIGURA 12 – ESPECTRO DE RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1)

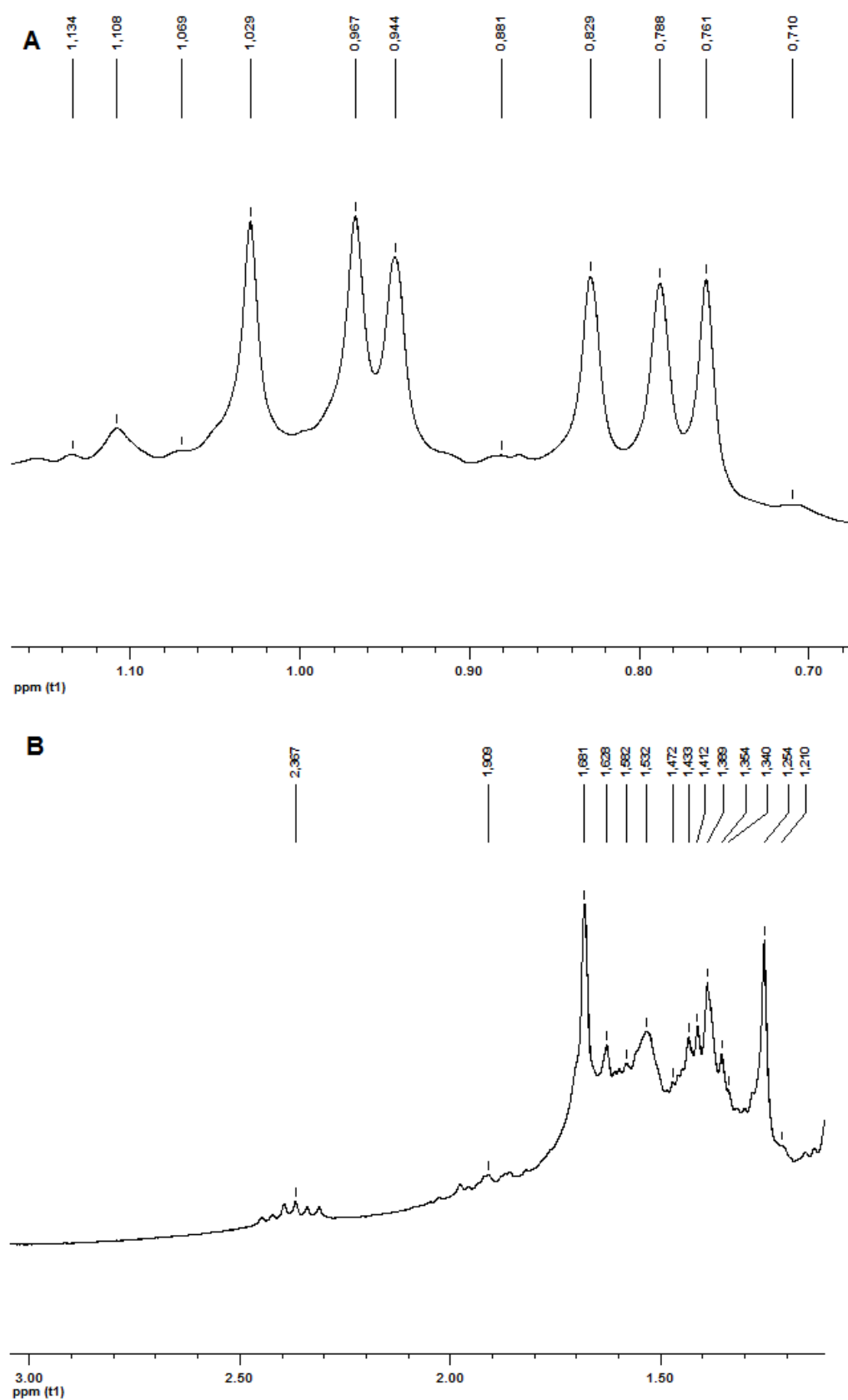


FIGURA 13 – EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1) NAS REGIÕES DE 0,70 a 1,16 ppm (A) E DE 1,20 a 3,00 ppm (B)

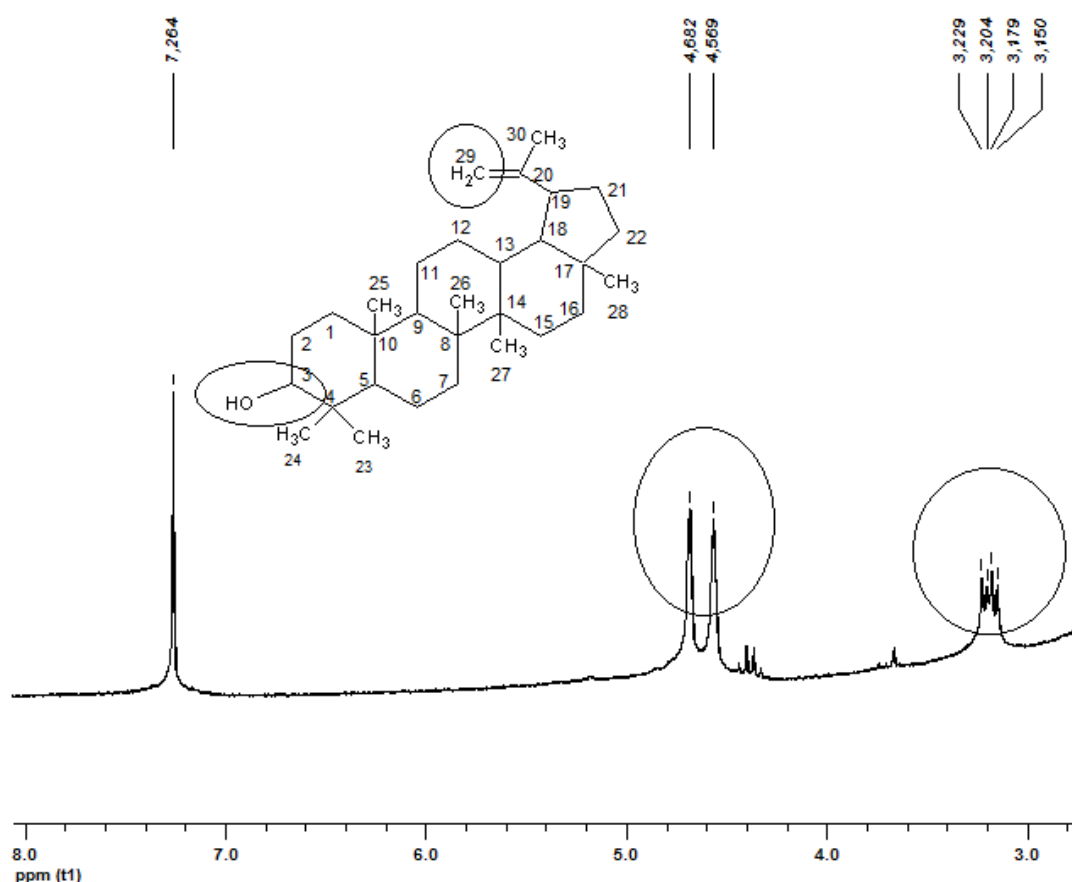


FIGURA 14 – EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1) NA REGIÃO DE 3,0 a 8,0 ppm

O espectro de massas mostrou o íon molecular em m/z em 426 e os outros picos característicos em 234, 219, 207, 189, 135, 121 e 107 (Figura 15), resultado semelhante ao relatado por Pinheiro *et al.* (2004).

A tabela 6 mostra a comparação dos valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H para a substância (1) com aqueles encontrados na literatura para lupeol (ARATANECHMUGE *et al.*, 2004).

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E ^1H (200 MHz, 50 MHz, ppm, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (1) COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA LUPEOL

Posição	RMN de ^{13}C	RMN de ^{13}C Literatura *	RMN de ^1H	RMN de ^1H Literatura *
1	38,6	38,7	1,63 (1H,m); 0,88 (1H,m)	1,65 (1H,m); 0,90 (1H,m)
2	27,5	27,4	1,58 (1H,m); 1,63 (1H,m)	1,59 (1H,m); 1,67 (1H,m)
3	79,0	79,0	3,23 (1H, dd, J=5,8; 10,0 Hz)	3,20 (1H, dd, J=5,03; 11,5 Hz)
4	38,7	38,8		
5	55,3	55,3	0,71 (1H,m)	0,68 (1H,m)
6	18,3	18,3	1,39 (1H,m); 1,53 (1H,m)	1,40 (1H,m); 1,50 (1H,m)
7	34,3	34,3	1,31 (1H,m); 1,43 (1H,m)	1,32 (1H,m); 1,42 (1H,m)
8	40,9	40,8		
9	50,5	50,4	1,25 (1H,s)	1,29 (1H,m)
10	37,2	37,1		
11	20,9	20,9	1,21 (1H,m); 1,41 (1H,m)	1,20 (1H,m); 1,40 (1H,m)
12	25,2	25,1	1,11 (1H,m); 1,63 (1H,m)	1,07 (1H,m); 1,68 (1H,m)
13	38,1	38,1	1,63 (1H,m)	1,68 (1H,m)
14	42,9	42,8		
15	27,5	27,4	1,03 (1H,m); 1,63 (1H,m)	1,00 (1H,m); 1,68 (1H,m)
16	35,6	35,6	1,35 (1H,m); 1,47 (1H,m)	1,37 (1H,m); 1,48 (1H,m)
17	43,0	42,9		
18	48,3	48,3	1,34 (1H,m)	1,37 (1H,m)
19	48,0	47,9	2,37 (1H,m)	2,38 (1H,m)
20	150,9	150,9		
21	29,9	29,8	1,39 (1H,m); 1,91 (1H,m)	1,37 (1H,m); 1,92 (1H,m)
22	40,0	39,9	1,39 (1H,m) ; 1,13 (1H,m)	1,37 (1H,m); 1,19 (1H,m)
23	28,0	27,9	0,97 (3H,s)	0,97 (3H,s)
24	15,4	15,4	0,76 (3H,s)	0,76 (3H,s)
25	16,0	16,1	0,83 (3H,s)	0,83 (3H,s)
26	15,6	15,9	1,03 (3H,s)	1,03 (3H,s)
27	14,6	14,5	0,94 (3H,s)	0,94 (3H,s)
28	18,0	17,9	0,79 (3H,s)	0,79 (3H,s)
29	109,3	109,3	4,57 (1H,d, J=2,2Hz); 4,68 (1H,d, J=2,2Hz)	4,54 (1H, brs); 4,67 (1H, brs)
30	19,3	19,3	1,68 (3H,s)	1,68 (3H,s)

* ARATANECHMUGE *et al.* (2004)

Após comparar e analisar os dados apresentados com os da literatura (ARATANECHMUGE *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2004), a substância (1) foi identificada como o triterpeno conhecido como **lupeol**.

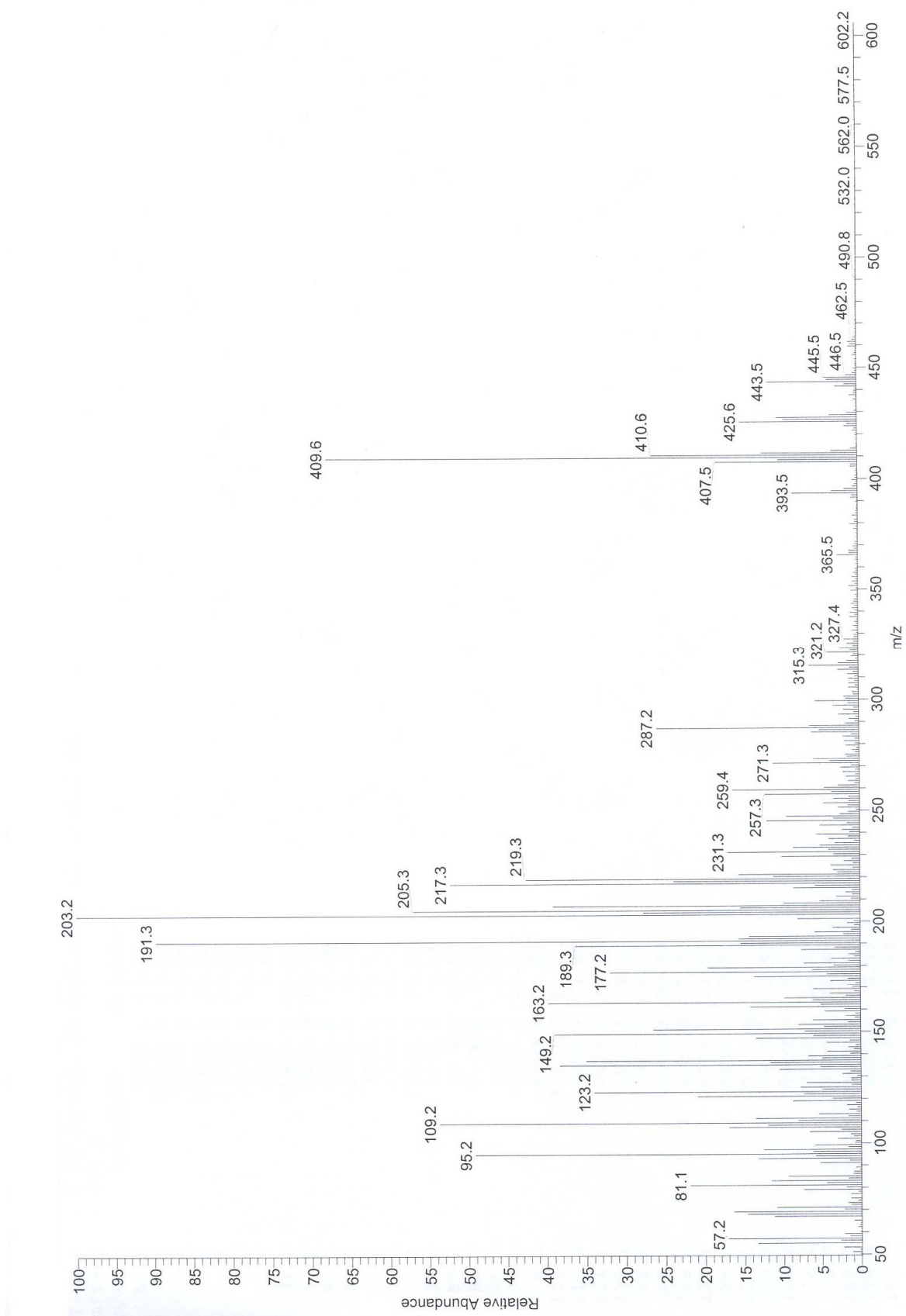


FIGURA 15 – ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA (1)

4.2.2 Identificação estrutural de (2)

O frasco 12 da coluna cromatográfica da FDCM foi submetido a uma solução gelada de éter de petróleo, freezer e filtração em funil de vidro sinterizado. Foram obtidos 206,5 mg de cristais, denominados F12. Após submeter a amostra F12 às análises de RMN de ^1H e ^{13}C , os espectros obtidos mostraram tratar-se de uma amostra impura. A purificação da F12 (103,3 mg) foi realizada por CLAE semi-preparativa. Nas condições estabelecidas para a cromatografia semi-preparativa, a substância **(2)** foi obtida na quantidade de 4,4 mg com tempo de retenção de 46 min. O rendimento de **(2)** foi de 4,25% em relação a F12. Esta substância representou 0,006% da FDCM e 0,0001% das cascas de *G. vellosii*.

A identificação da substância **(2)** foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H , COSY, HMQC, faixa de fusão, rotação óptica específica, e comparação desses dados aos da literatura.

Ao analisar o espectro de RMN de ^{13}C , foram verificados 10 sinais na região de 54,5 a 147,9 ppm (Figura 16).

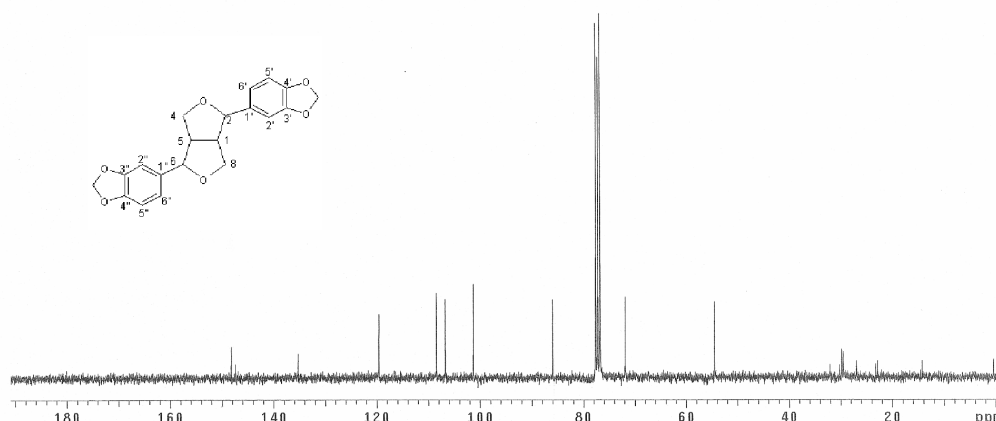


FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **(2)**

A faixa de fusão foi de 117 a 120°C. Esta faixa de fusão está próxima a de 123 a 124°C, relatada por Rana, Guin e Roy (2000). A medida da rotação óptica específica foi $[\alpha]_D^{20} = +85$ (0,0007 g mL⁻¹, clorofórmio).

O grupo metilenodióxido (-O-CH₂-O) foi confirmado pelo espectro de RMN de ¹H que indicou um singlete em 5,89 ppm e pelo espectro de HMQC que mostrou este sinal associado ao sinal de carbono em 101,3 ppm (Figuras 17 e 19).

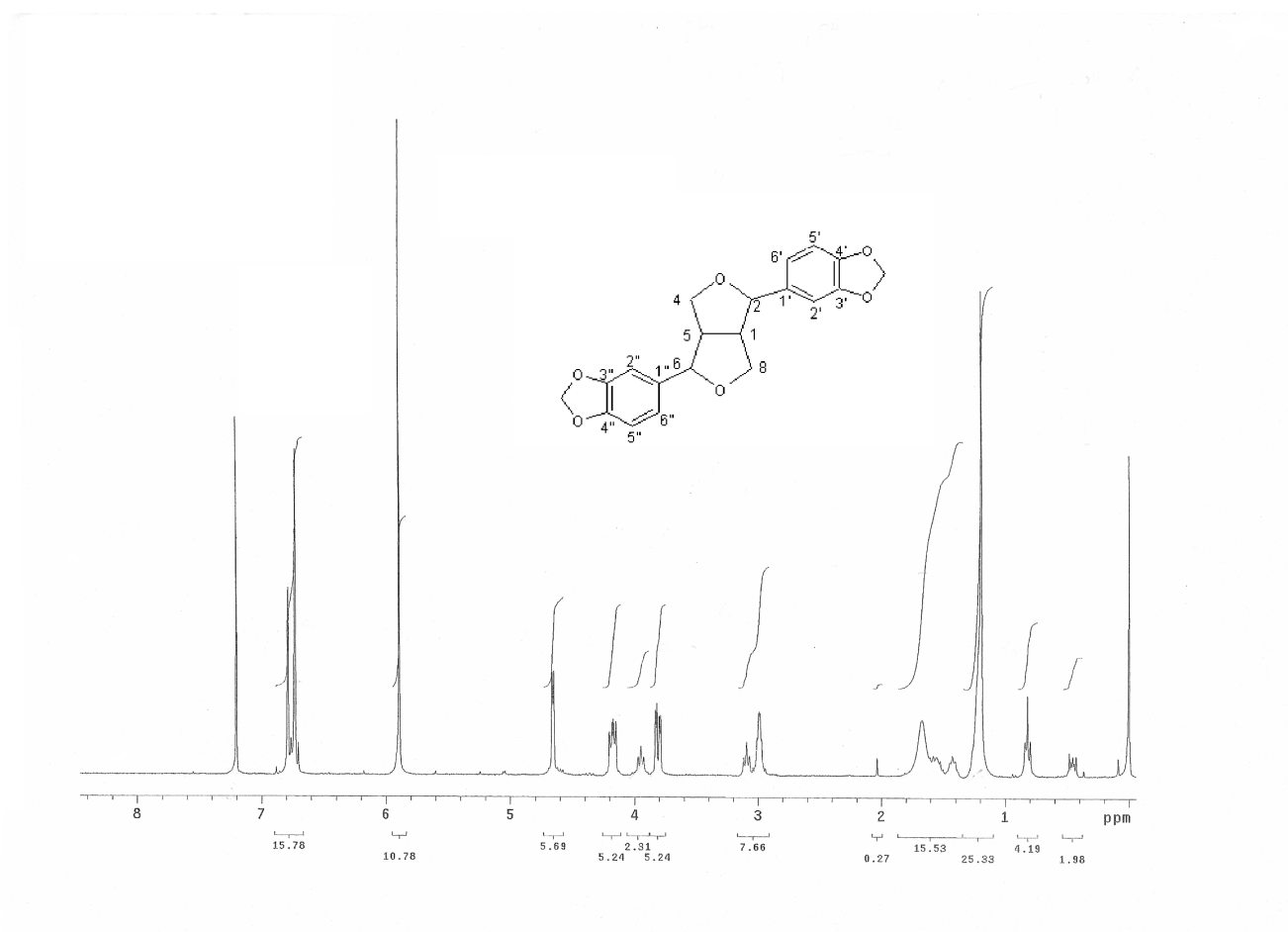


FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) DA SUBSTÂNCIA (2)

O espectro de RMN de ¹H indicou os hidrogênios aromáticos em 6,73 e 6,79 ppm (Figura 17). O espectro de COSY mostrou os acoplamentos desses hidrogênios (Figura 18) e o espectro de HMQC revelou esses hidrogênios associados aos respectivos carbonos aos sinais em 106,7, 108,4 e 119,6 ppm (Figura 19).

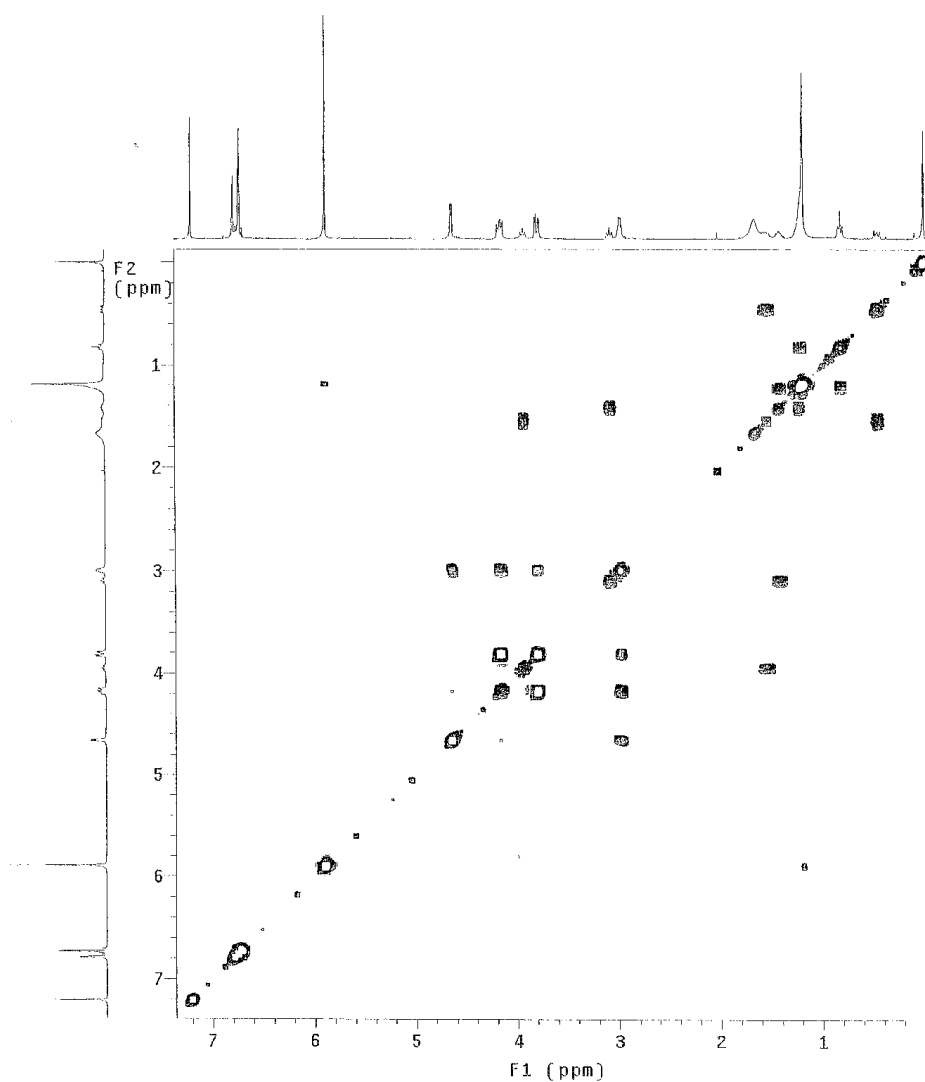


FIGURA 18 – ESPECTRO RMN 2D DE COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) DA SUBSTÂNCIA (2)

O espectro de HMQC indicou um dubleto em 4,66 ppm, associado ao sinal de carbono em 86,0 ppm; um multiplete em 3,00 ppm, associado ao sinal de carbono em 54,5 ppm e duplo dubleto em 3,83 e 4,20 ppm, associados ao sinal de carbono em 71,92 ppm (Figura 19). A expansão do espectro de COSY na região de 1,5 a 4,5 ppm mostra os sinais do hidrogênio em 3,00 ppm acoplando com os hidrogênios em 4,66, 3,83 e 4,20 ppm (Figura 20). Ou seja, o hidrogênio do carbono em 54,5 ppm (CH) acoplando com os hidrogênios dos carbonos em 86,0 (CH) e 71,9 ppm (CH_2). Esta seqüência de sinais e acoplamentos foi de suma importância para a elucidação da estrutura molecular da substância em estudo.

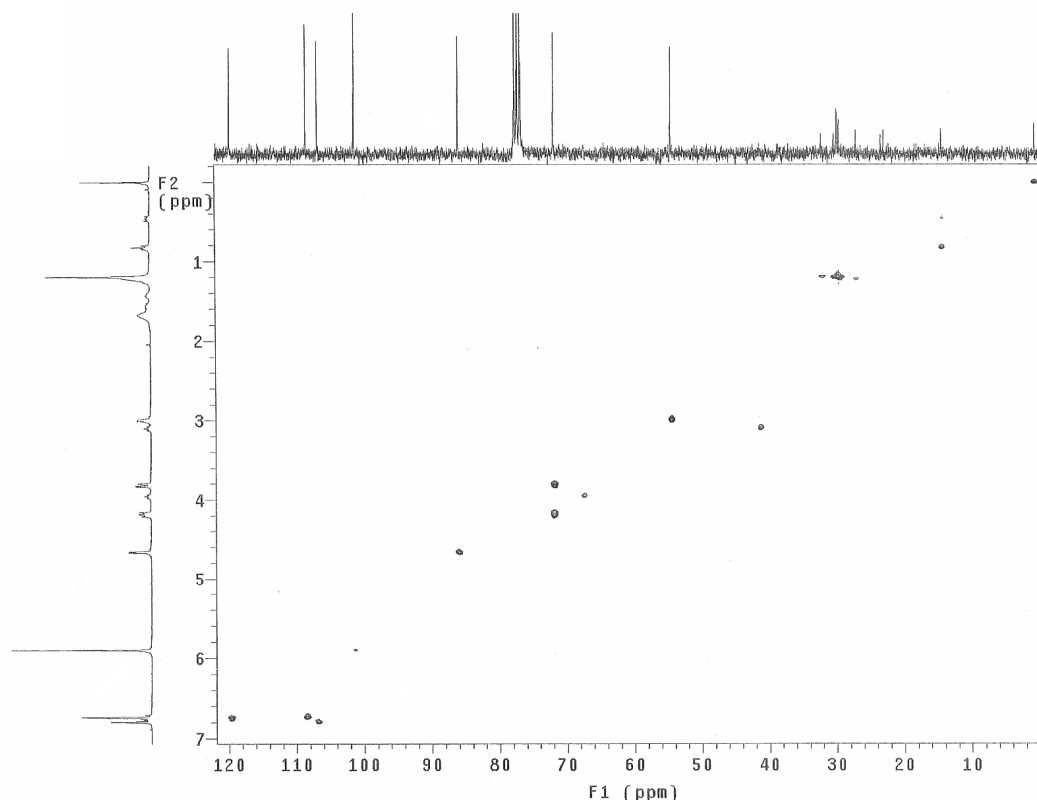


FIGURA 19 – ESPECTRO RMN 2D DE HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) DA SUBSTÂNCIA (2)

A tabela 7 sumariza a comparação dos valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H para a substância (2) com aqueles encontrados na literatura (JAYASINGHE *et al.*, 2003) para **sesamina**, uma molécula simétrica com 20 carbonos.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E ^1H (300 MHz, 75 MHz, ppm, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (2) COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA SESAMINA

Posição	RMN de ^{13}C	RMN de ^{13}C Literatura *	RMN de ^1H	RMN de ^1H Literatura *
1 e 5	54,5	54,3	3,0 (2H, <i>m</i>)	3,05 (2H, <i>m</i>)
2 e 6	86,0	85,6	4,66 (2H, <i>d</i> , $J=4,5$ Hz)	4,71 (2H, <i>d</i> , $J=4,4$ Hz)
4 e 8	71,9	71,7	3,83 (2H, <i>dd</i> , $J=9,3$; 3,3Hz) 4,20 (2H, <i>dd</i> , $J=9,0$; 6,6Hz)	3,87 (2H, <i>dd</i> , $J=9,3$; 3,7 Hz) 4,23 (2H, <i>dd</i> , $J=9,3$; 6,8 Hz)
1' e 1''	135,2	135,0		
2' e 2''	106,7	106,5	6,79 (2H, <i>d</i> , $J=4,5$ Hz)	6,84 (2H, <i>d</i> , $J=1,2$ Hz)
3' e 3''	148,17	148,0		
4' e 4''	147,3	147,1		
5' e 5''	108,4	108,2	6,73 (2H, <i>d</i> , $J=8,1$ Hz)	6,77 (2H, <i>d</i> , $J=7,9$ Hz)
6' e 6''	119,6	119,4	6,73 (2H, <i>d</i> , $J=8,1$ Hz)	6,80 (2H, <i>dd</i> , $J=7,9$; 1,5 Hz)
-OCH ₂ O-	101,3	101,1	5,89 (4H, <i>s</i>)	5,95 (4H, <i>s</i>)

* JAYASINGHE *et al.* (2003)

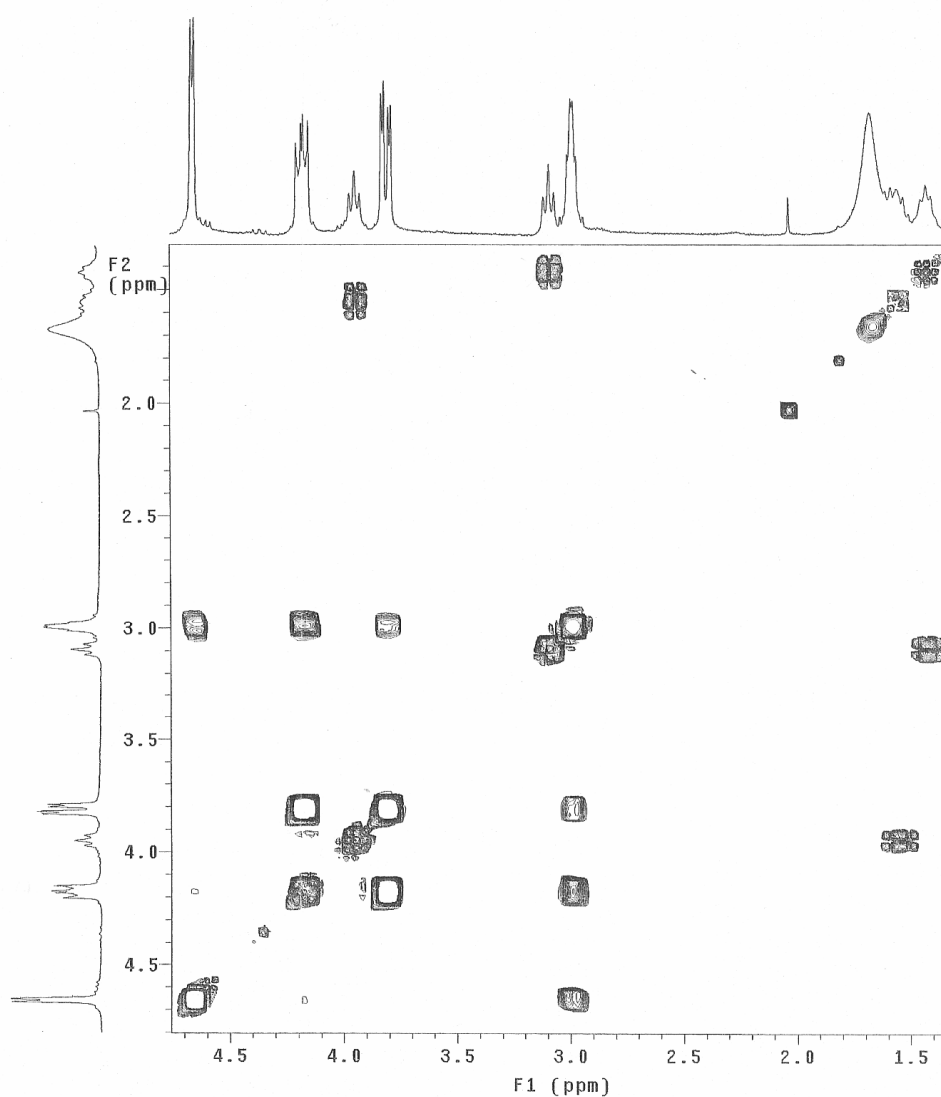


FIGURA 20 - EXPANSÃO DO ESPECTRO RMN 2D DE COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) DA SUBSTÂNCIA (2) NA REGIÃO DE 1,5 a 4,7 ppm

Após comparar e analisar os dados apresentados com os da literatura (RANA; GUIN; ROY, 2000; JAYASINGHE *et al.*, 2003), a substância (2) foi identificada como (+)-**sesamina**. A presença das substâncias lupeol e sesamina, juntas na mesma espécie vegetal também foi relatada nas espécies *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN (Rutaceae) (FACUNDO *et al.*, 2005), *Zanthoxylum tingoassuiba* A. ST. HIL. (SILVA *et al.*, 2008) e *Zanthoxylum setulosum* P. Wilson (WALKER *et al.*, 2011).

4.2.3 Identificação estrutural de (3)

O frasco 16 da coluna cromatográfica da FDCM foi submetido a uma solução gelada contendo éter de petróleo e acetato de etila na proporção de 95:05 (v/v), freezer e filtração em funil de vidro sinterizado. Foram obtidos 284,3 mg de cristais, denominados **(3)**. Esta substância representou 0,426% da FDCM e 0,0075 % das cascas de *G. vellosii*. A identificação da substância **(3)** foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H , DEPT 135°, COSY, HMQC, faixa de fusão, rotação óptica específica, e comparação desses resultados aos da literatura.

Ao analisar o espectro de RMN de ^{13}C , foram verificados sinais na região de 7,03 a 171,74 ppm. O carbono do grupo carbonila foi verificado em 171,7 ppm e o sinal do carbono quaternário do esqueleto indólico (C-7) foi encoberto em 53,8 ppm (Figura 21).

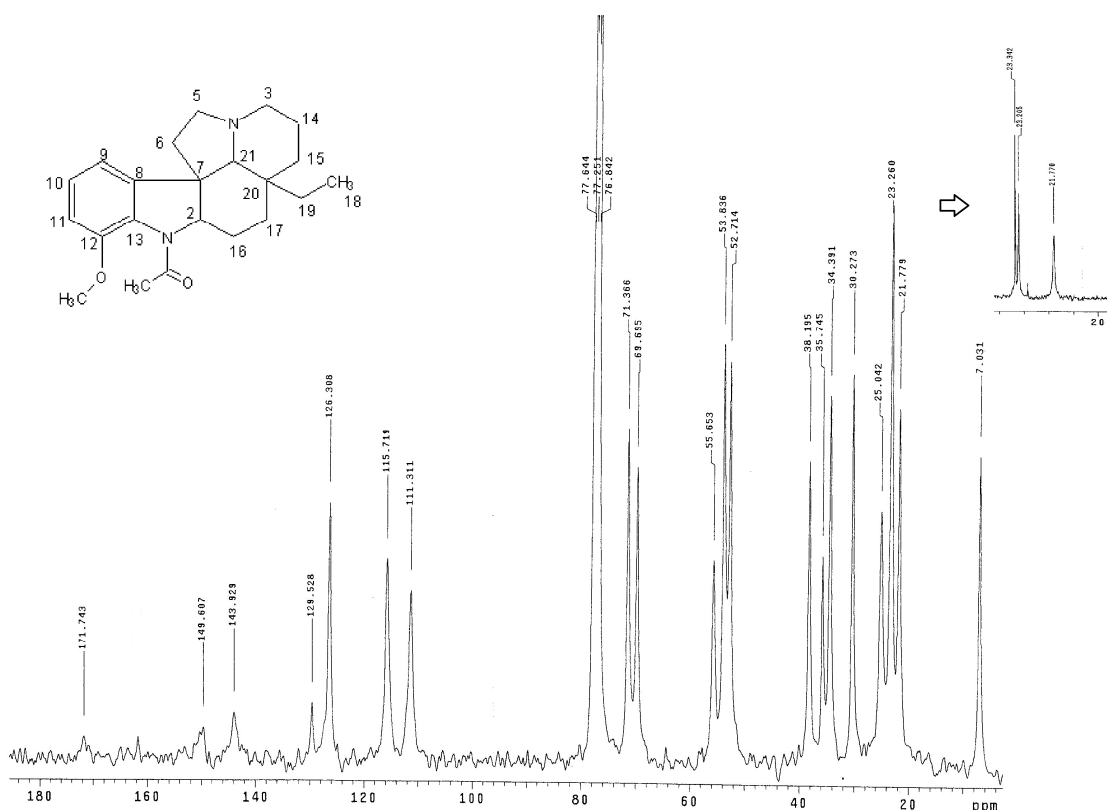


FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **(3)**

A análise dos espectros de RMN de ^1H mostrou os hidrogênios aromáticos de H-9, H-10 e H-11 em 6,82 e 7,07 ppm (Figura 22) e seus acoplamentos foram confirmados pelo espectro de COSY (Figura 23). O espectro de HMQC mostrou estes hidrogênios associados aos respectivos carbonos aos sinais em 115,72, 126,31 e 111,3 ppm (Figura 24).

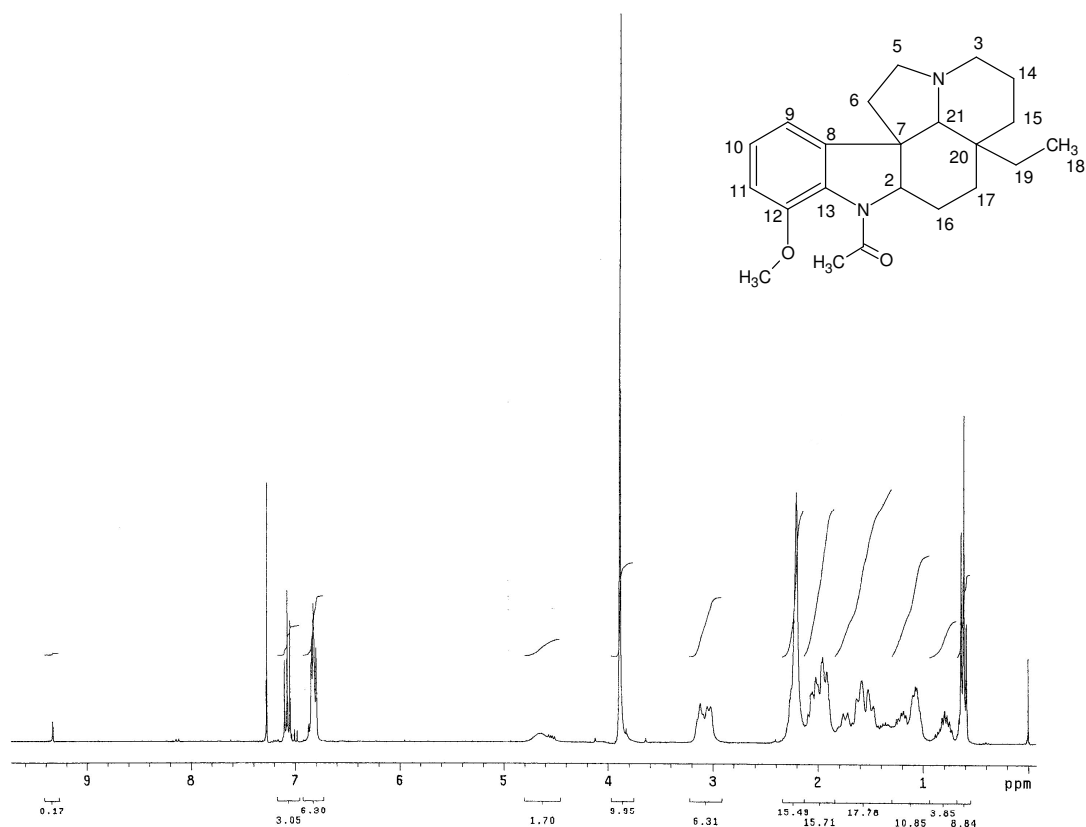


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (300 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (**3**)

No espectro de RMN de ^1H também foram verificados: um triplete em 0,64 ppm referente ao grupo metila do carbono 18, um singlete em 2,20 ppm referente a carbonila da amida e um singlete em 3,88 ppm referente ao grupo metoxila (Figura 22).

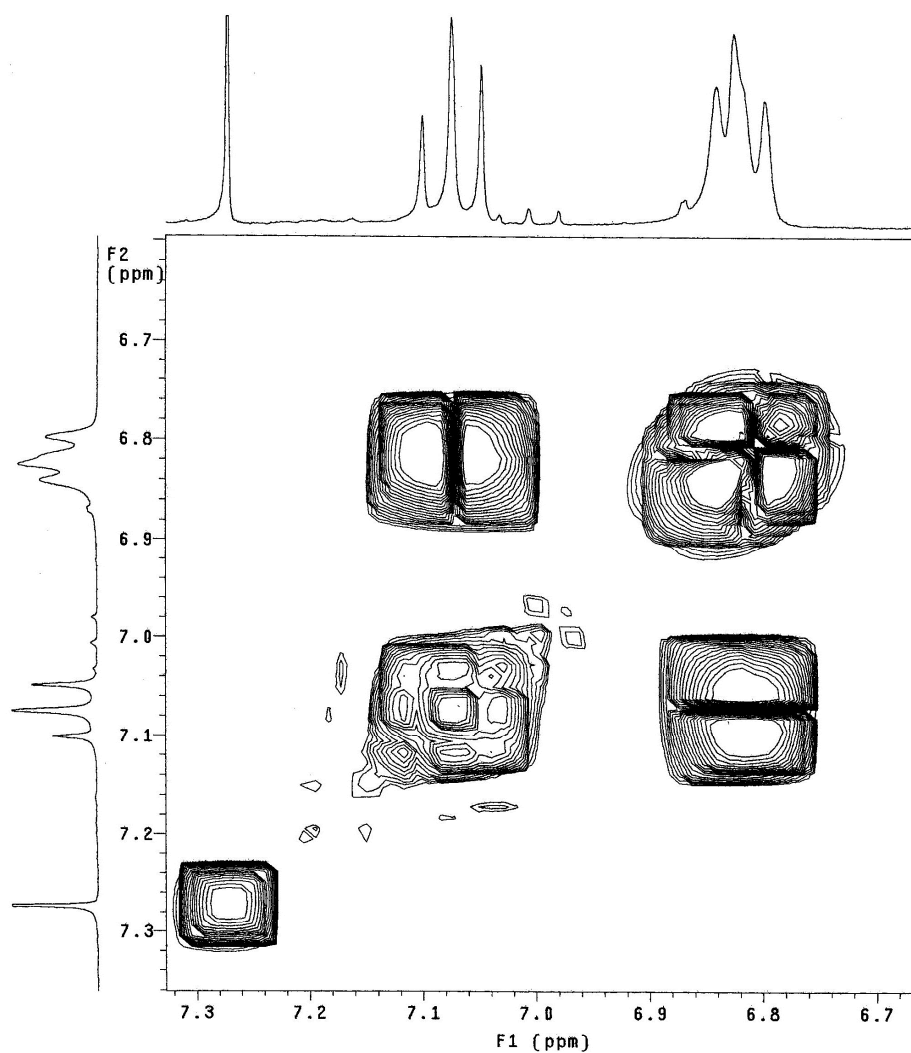


FIGURA 23 – EXPANSÃO DO ESPECTRO RMN 2D DE COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) DA SUBSTÂNCIA (3) NA REGIÃO DE 6,7 a 7,3 ppm

O espectro de HMQC mostrou os hidrogênios do grupo metoxila associados ao sinal de carbono em 55,65 ppm e os hidrogênios do grupo metila associados ao sinal de carbono em 7,03 ppm (Figura 24).

O espectro de DEPT 135° mostrou 3 carbonos metílicos, 5 carbonos metínicos e 8 carbonos metilênicos (Figura 25).

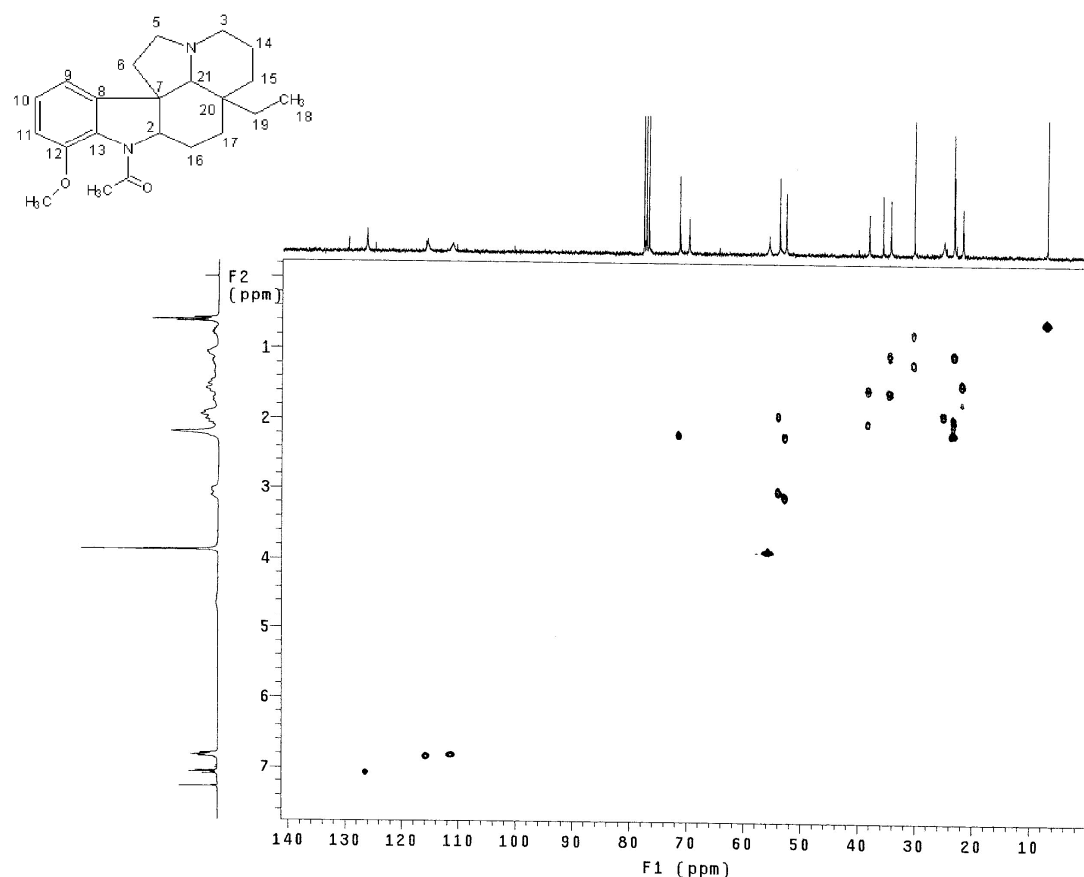


FIGURA 24 - ESPECTRO RMN 2D DE HMQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) DA SUBSTÂNCIA (3)

A tabela 8 sumariza a comparação dos valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e ^1H e para a substância (3) com aqueles encontrados na literatura para aspidospermina (CAMPBELL; JACKSON; RAVENSCROFT, 1993; GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012).

O espectro de massas mostrou o íon molecular em m/z em 354 e os outros picos característicos em 339, 326, 312, 152 e 124 (Figura 26), resultado semelhante ao de Craveiro, Matos e Serur (1983). A faixa de fusão foi de 199 a 208°C, próxima de 206,5 a 207 °C, relatada por Craveiro, Matos e Serur (1983). A medida da rotação óptica específica foi $[\alpha]_D^{20} = + 70$ (0,0004 g mL $^{-1}$, clorofórmio).

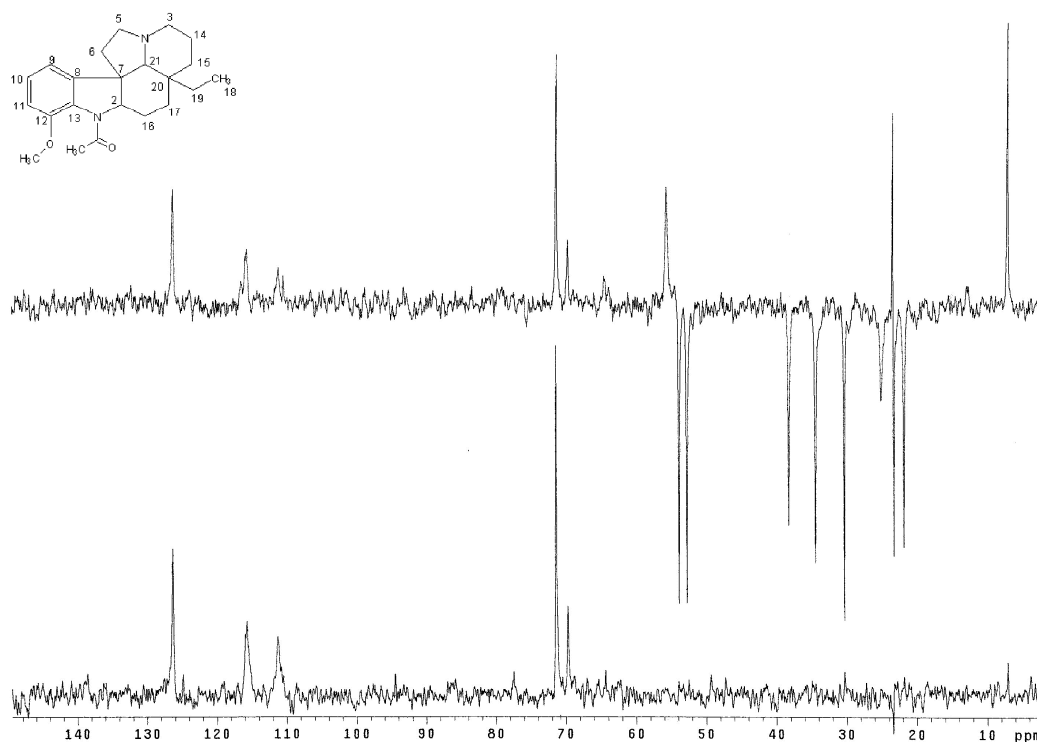


FIGURA 25 – ESPECTRO DE DEPT 135° DA SUBSTÂNCIA (3)

Após comparar e analisar os dados apresentados com os da literatura (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983; CAMPBELL; JACKSON; RAVENSCROFT, 1993; GUIMARÃES; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2012), a substância (3) foi identificada como (+)-**aspidospermina**.

A presença de alcaloides do tipo aspidospermina já foi relatada no gênero *Geissospermum*, na espécie *G. argenteum* (PACCIONI; HUSSON, 1978). A aspidospermina apresenta atividade diurética, hipotensiva e estimulante respiratória (FUMAGALI *et al.*, 2008). Galarreta *et al.* (2008) demonstraram sua atividade tripanocida.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E ^1H (300 MHz, 75 MHz, ppm, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA (3) COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA ASPIDOSPERMINA

Posição e DEPT 135°	RMN de ^{13}C	RMN de ^{13}C Literatura **	RMN de ^1H	RMN de $^1\text{H}^*$ Literatura ***
2 CH	69,7	69,5	4,12 (m)	4,5 (1H, m)
3 CH ₂	53,8	53,5	1,95 (m)	1,9 (m)
			3,05 (m)	3,0 (brd, $J = 10,7$ Hz)
5 CH ₂	52,7	52,4	2,25 (m)	2,25 (m)
			3,20 (m)	3,11 (td, $J = 9$ e $3,2$ Hz)
6 CH ₂	38,2	37,9	1,56 (m)	1,55 (m)
			2,02 (m)	2,05 (m)
7 C	53,8*	53,4		
8 C	143,9	143,4		
9 CH	115,7	115,4	6,82 (m)	6,83 (d, $J = 8,7$ Hz)
10 CH	126,3	126,0	7,07 (t, $J = 15,6$ Hz)	7,07 (t, $J = 8,7$ Hz)
11 CH	111,3	111,2	6,82 (m)	6,8 (d, $J = 8,7$ Hz)
12 C	149,6	149,5		
13 C	129,5	129,3		
14 CH ₂	21,9	21,5	1,46 (m)	1,5 (brd, $J = 13$ Hz)
			1,76 (m)	1,73 (qt, $J = 13,4$ Hz)
15 CH ₂	34,4	34,1	1,07 (m)	1,05 (m)
			1,63 (m)	1,6 (m)
16 CH ₂	25,0	24,8	1,90 (m)	1,95 (m)
				1,35 (m)
17 CH ₂	23,2	22,9	1,02 (m)	1,1 (m)
			2,00 (m)	2,0 (m)
18 CH ₃	7,0	6,7	0,64 (t, $J = 14,7$ Hz)	0,6 (t, $J = 7,1$ Hz)
19 CH ₂	30,3	30,0	0,77 (m)	0,8 (dq, $J = 14$ e $7,1$ Hz)
			1,23 (m)	1,2 (dq, $J = 14$ e $7,1$ Hz)
20 C	35,7	35,5		
21 CH	71,4	71,0	2,20 (s)	2,23 (1H, s)
-OCH ₃	55,6	55,4	3,88 (3H, s)	3,87 (3H, s)
-CO	171,7	171,2		
-CH ₃	23,3	23,0	2,20 (3H, s)	2,2 (3H, s)

* sinal encoberto em 53,8 ppm. ** CAMPBELL, JACKSON e RAVENSCROFT (1993). *** GUIMARÃES, BRAZ-FILHO e VIEIRA (2012)

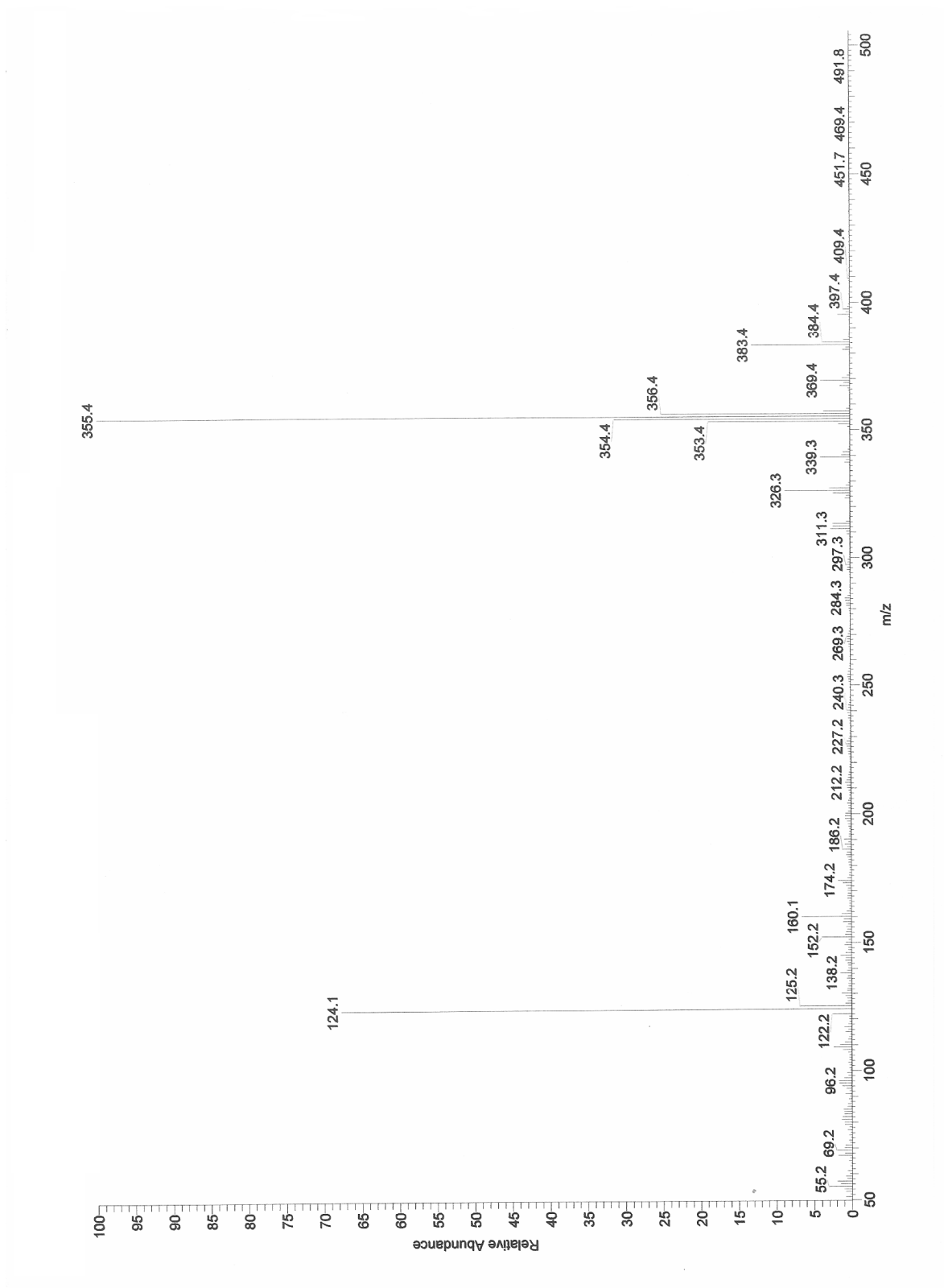


FIGURA 26 – ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA (3)

4.2.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE F14

O frasco 14 da coluna cromatográfica da FDCM foi submetido a uma solução gelada contendo éter de petróleo e acetato de etila na proporção de 95:05 (v/v), freezer e filtração em funil de vidro sinterizado. Foram obtidos 110,3 mg de cristais, denominados F14. Esta amostra representou 0,165% da FDCM e 0,0029% das cascas de *G. vellosii*. A identificação de F14 foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e ^1H e DEPT 135°.

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou sinais na faixa de 6,78 a 161,74 ppm (Figura 27).

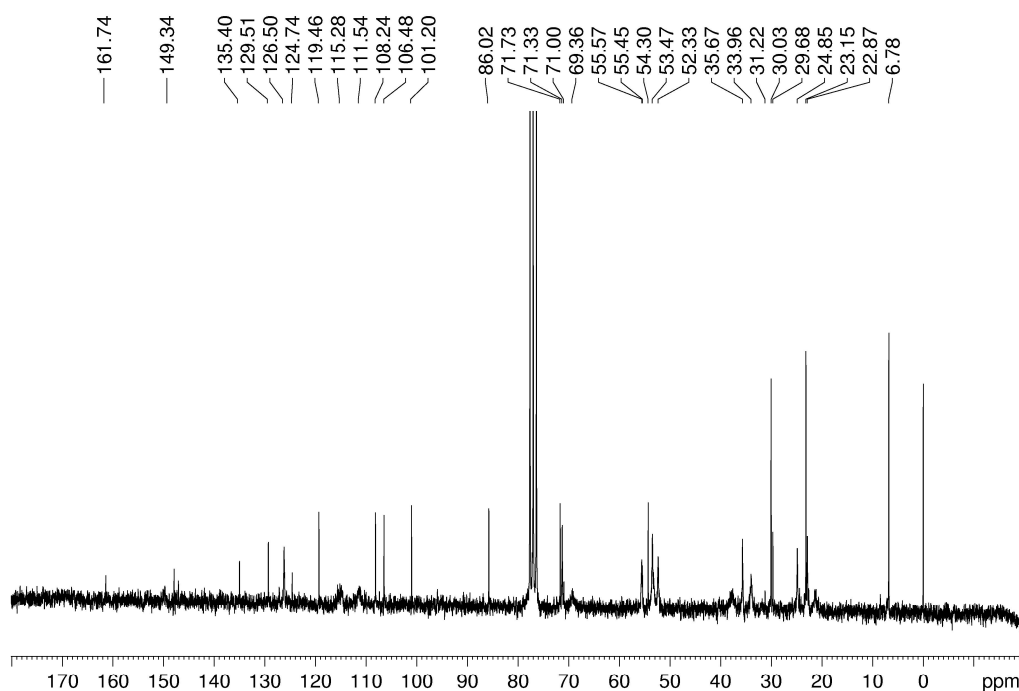


FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DA AMOSTRA F14

A análise de RMN de ^1H mostrou os hidrogênios aromáticos em aproximadamente 7,00 ppm (Figura 28), semelhantes aos das substâncias **(2)** e **(3)**. O grupo metilenodióxido foi confirmado pela presença do CH_2 cetálico em 101,18 ppm relacionado ao singlete em 5,96 ppm (FRANÇA *et al.*, 2005) (Figuras 27 e 28), semelhante a substância **(2)**.

Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H mostraram o carbono metoxílico, atribuído a 54,30 ppm, e seus hidrogênios ao sinal de 3,89 ppm (Figuras 27 e 28), semelhante à substância **(3)**. Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° mostraram os sinais de carbonos metínicos em 54,30 e 86,02 ppm, e de um carbono metilênico em 71,73 ppm (Figuras 28 e 29), característicos da substância **(2)**. A faixa de fusão foi de 168 a 190°C. Após análise dos espectros obtidos verificou-se a amostra **F14** contém sinais característicos das substâncias **(2)** e **(3)**, sendo, portanto identificada como a mistura dessas.

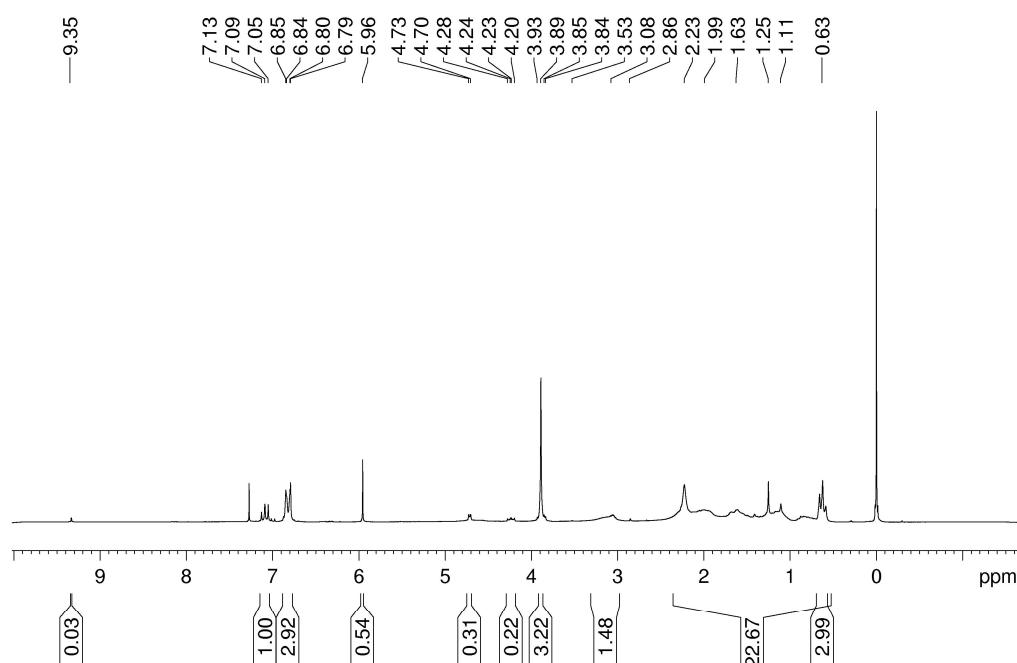


FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) DA AMOSTRA F14

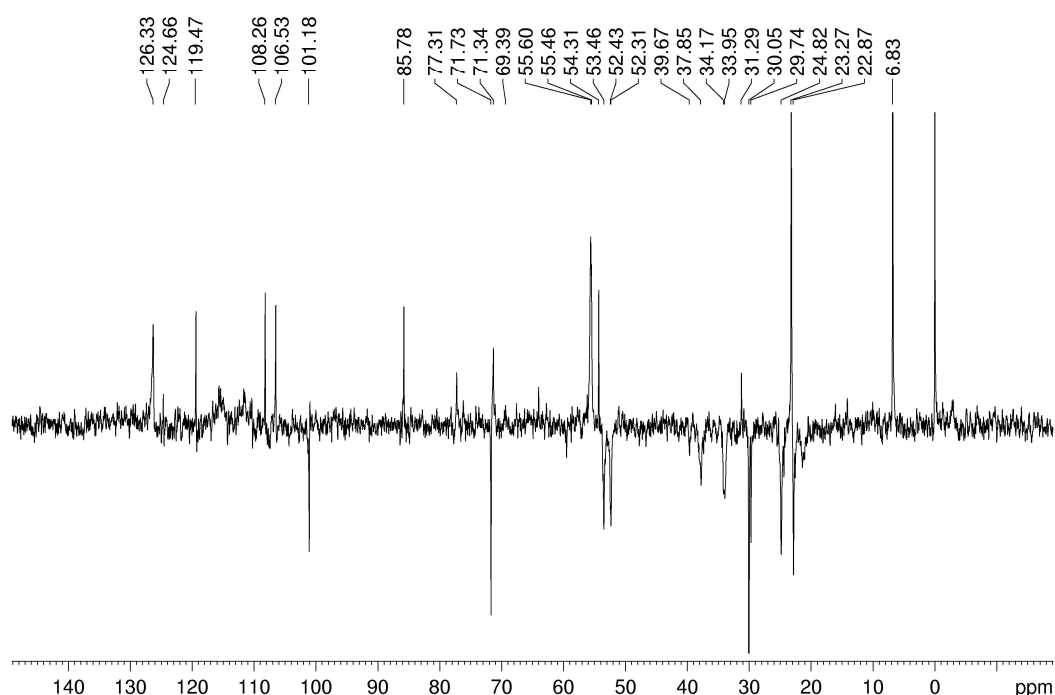


FIGURA 29 – ESPECTRO DE DEPT 135° DA AMOSTRA F14

4.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Neste trabalho, o estudo da atividade alelopática foi realizado por meio de três técnicas com o intuito de verificar a capacidade do extrato bruto etanólico, frações e constituintes isolados de *G. vellosii* em influenciar germinação, crescimento, respiração celular, teor de clorofila, atividade enzimática, índice mitótico radicular e reversibilidade de duas espécies alvo. A espécie alvo *L. sativa* conhecida como alface, foi empregada por apresentar germinação rápida e uniforme (DIETZ; WINTERHALTER, 1996), ser pequena, possuir grande superfície de contato, ser sensível ao meio que a rodeia (FERREIRA; AQUILA, 2000; MALHEIROS; PERES, 2001) e não requerer nenhuma manipulação além do contato no meio (MALHEIROS; PERES, 2001).

A segunda espécie alvo, *Triticum aestivum*, conhecida como trigo foi escolhida por ser utilizada em ensaios alelopáticos (GNIAZDOWSKA; BOGATEK, 2005) e apresentar maior resistência, pois há relatos sobre a competição entre esta espécie e plantas daninhas (NOVO *et al.*, 2009) e inibição da germinação e desenvolvimento da própria espécie por resteva (FERREIRA; AQUILA, 2000).

4.3.1 Avaliação da atividade alelopática por meio de caixa de poliestireno

As amostras F12 e **(3)** não influenciaram no IVG, porém a FDCM, FB e FHA, o inibiram. No crescimento radicular, somente F12 e **(3)** o inibiram, e no crescimento do hipocótilo houve inibição pelas amostras F12, FAE, FDCM e FHA (Tabelas 9 a 12 e Figura 30). Verificou-se também que não houve diferença estatística entre o controle água destilada e o controle metanol, demonstrando que o solvente utilizado no ensaio não influenciou nos resultados (Tabelas 9 a 12).

TABELA 9 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *L. sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO

AMOSTRA	0,8 mg	0,4 mg	0,2 mg	0,1 mg	CA	CM
EB	5,00 a	5,00 a	5,00 a	5,00 a	5,00 a	5,00 a
FDCM	5,00 a	4,88 a	4,70 b	5,00 a	5,00 a	5,00 a
FAE	2,42 a	2,42 a	2,41 a	2,50 a	2,50 a	2,50 a
FB	2,50 a	2,37 a	2,29 b	2,50 a	2,50 a	2,50 a
FHA	2,50 a	2,08 b	2,50 a	2,29 c	2,50 a	2,50 a
F12	1,12 a	0,91 a	0,95 a	1,07 a	0,91 a	0,98 a
Substância (3)	1,12 a	1,02 a	1,12 a	1,08 a	0,91 a	0,98 a

NOTAS: (1) CA = controle água; CM = controle metanol; EB = extrato bruto etanólico; FDCM = fração diclorometano; FAE = fração acetato de etila; FB = fração butanol; FHA = fração hidroalcoólica; F12 e **(3)** = constituintes isolados.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

TABELA 10 - CRESCIMENTO DE *L. sativa* SUBMETIDA AOS CONSTITUINTES ISOLADOS DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO

F12							
Radícula				Hipocótilo			
Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)
0,1 mg - 1	1,8 a	0,8 mg - 1	<u>2,8 a</u>	0,1 mg - 1	<u>0,6 a</u>	0,8 mg - 1	<u>0,6 a</u>
0,1 mg - 2	3,6 b	0,8 mg - 2	<u>1,8 a</u>	0,1 mg - 2	<u>1,2 a</u>	0,8 mg - 2	<u>0,8 a</u>
0,1 mg - 3	3,0 a	0,8 mg - 3	<u>1,6 a</u>	0,1 mg - 3	<u>0,8 a</u>	0,8 mg - 3	<u>0,8 a</u>
0,1 mg - 4	4,2 b	0,8 mg - 4	<u>3,0 a</u>	0,1 mg - 4	<u>3,8 b</u>	0,8 mg - 4	<u>1,4 a</u>
0,2 mg - 1	2,4 a	CA - 1	4,4 b	0,2 mg - 1	1,2 a	CA - 1	6,0 b
0,2 mg - 2	2,4 a	CA - 2	3,6 b	0,2 mg - 2	2,6 a	CA - 2	3,2 b
0,2 mg - 3	3,6 b	CA - 3	4,0 b	0,2 mg - 3	3,6 b	CA - 3	5,8 b
0,2 mg - 4	1,4 a	CA - 4	4,2 b	0,2 mg - 4	1,6 a	CA - 4	3,2 b
0,4 mg - 1	2,8 a	CM - 1	3,4 b	0,4 mg - 1	<u>0,4 a</u>	CM - 1	3,3 b
0,4 mg - 2	3,8 b	CM - 2	3,6 b	0,4 mg - 2	<u>1,0 a</u>	CM - 2	3,2 b
0,4 mg - 3	4,0 b	CM - 3	4,8 b	0,4 mg - 3	<u>3,4 b</u>	CM - 3	6,4 b
0,4 mg - 4	4,4 b	CM - 4	4,0 b	0,4 mg - 4	<u>1,4 a</u>	CM - 4	6,0 b

SUBSTANCIA (3)							
Radícula				Hipocótilo			
Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)
0,1 mg - 1	<u>3,0 a</u>	0,8 mg - 1	<u>2,0 a</u>	0,1 mg - 1	3,0 b	0,8 mg - 1	2,8 b
0,1 mg - 2	<u>4,8 b</u>	0,8 mg - 2	<u>2,2 a</u>	0,1 mg - 2	4,2 b	0,8 mg - 2	1,8 a
0,1 mg - 3	<u>2,4 a</u>	0,8 mg - 3	<u>3,2 a</u>	0,1 mg - 3	1,4 a	0,8 mg - 3	2,6 a
0,1 mg - 4	<u>2,2 a</u>	0,8 mg - 4	<u>5,4 b</u>	0,1 mg - 4	1,0 a	0,8 mg - 4	5,2 b
0,2 mg - 1	<u>3,0 a</u>	CA - 1	4,4 b	0,2 mg - 1	3,0 b	CA - 1	6,0 b
0,2 mg - 2	<u>2,0 a</u>	CA - 2	3,6 b	0,2 mg - 2	1,8 a	CA - 2	3,2 b
0,2 mg - 3	<u>2,6 a</u>	CA - 3	4,0 b	0,2 mg - 3	3,6 b	CA - 3	5,8 b
0,2 mg - 4	<u>2,6 a</u>	CA - 4	4,2 b	0,2 mg - 4	3,0 b	CA - 4	3,2 b
0,4 mg - 1	4,2 b	CM - 1	3,4 b	0,4 mg - 1	3,2 b	CM - 1	3,3 b
0,4 mg - 2	4,0 b	CM - 2	3,6 b	0,4 mg - 2	5,0 b	CM - 2	3,2 b
0,4 mg - 3	2,8 a	CM - 3	4,8 b	0,4 mg - 3	0,4 a	CM - 3	6,4 b
0,4 mg - 4	2,4 a	CM - 4	4,0 b	0,4 mg - 4	1,2 a	CM - 4	6,0 b

NOTAS: (1) CA = controle água e CM = controle metanol.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

As alterações na germinação podem ser resultantes de alterações na permeabilidade de membranas, na transcrição e tradução do DNA, no funcionamento de mensageiros secundários, na respiração devido ao seqüestro de oxigênio, na conformação de enzimas e receptores, ou pela combinação destes (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006). E, a inibição da germinação pode ser por bloqueio da hidrolização dos nutrientes dos tecidos de reserva, afetando a divisão celular, porém esta influência pode ser temporária, pois pode haver degradação da substância tóxica em não tóxica (NOVO *et al.*, 2009).

TABELA 11 - CRESCIMENTO DE *L. sativa* SUBMETIDA AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DICLOROMETANO E ACETATO DE ETILA DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO

EXTRATO BRUTO ETANÓLICO							
Radícula				Hipocótilo			
Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)
0,1 mg - 1	37,0 b	0,8 mg - 1	40,0 b	0,1 mg - 1	29,0 b	0,8 mg - 1	30,4 b
0,1 mg - 2	39,0 b	0,8 mg - 2	34,0 b	0,1 mg - 2	25,0 a	0,8 mg - 2	28,0 b
0,1 mg - 3	35,0 b	0,8 mg - 3	37,4 b	0,1 mg - 3	28,0 b	0,8 mg - 3	30,0 b
0,1 mg - 4	38,0 b	0,8 mg - 4	43,2 b	0,1 mg - 4	28,0 b	0,8 mg - 4	30,2 b
0,2 mg - 1	31,0 b	CA - 1	33,0 b	0,2 mg - 1	22,0 a	CA - 1	32,0 b
0,2 mg - 2	38,0 b	CA - 2	38,0 b	0,2 mg - 2	32,0 b	CA - 2	29,0 b
0,2 mg - 3	36,0 b	CA - 3	33,0 b	0,2 mg - 3	33,0 b	CA - 3	32,0 b
0,2 mg - 4	30,0 b	CA - 4	40,6 b	0,2 mg - 4	28,0 b	CA - 4	29,6 b
0,4 mg - 1	35,0 b	CM - 1	37,0 b	0,4 mg - 1	25,0 a	CM - 1	27,8 b
0,4 mg - 2	34,0 b	CM - 2	33,0 b	0,4 mg - 2	30,0 b	CM - 2	31,0 b
0,4 mg - 3	26,0 b	CM - 3	33,6 b	0,4 mg - 3	27,0 b	CM - 3	29,2 b
0,4 mg - 4	39,0 b	CM - 4	41,2 b	0,4 mg - 4	27,0 b	CM - 4	29,0 b

FRAÇÃO DICLOROMETANO							
Radícula				Hipocótilo			
Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)
0,1 mg - 1	33,0 b	0,8mg - 1	38,8 b	<u>0,1mg - 1</u>	<u>17,0 a</u>	0,8 mg - 1	27,0 b
0,1 mg - 2	42,0 b	0,8mg - 2	28,8 b	<u>0,1mg - 2</u>	<u>19,0 a</u>	0,8 mg - 2	20,4 b
0,1 mg - 3	33,0 b	0,8mg - 3	36,8 b	<u>0,1mg - 3</u>	<u>22,0 a</u>	0,8 mg - 3	30,0 b
0,1 mg - 4	42,0 b	0,8mg - 4	39,2 b	<u>0,1mg - 4</u>	<u>25,0 a</u>	0,8 mg - 4	29,0 b
0,2 mg - 1	36,0 b	CA - 1	33,0 b	0,2 mg - 1	31,0 b	CA - 1	32,0 b
0,2 mg - 2	35,0 b	CA - 2	38,0 b	0,2 mg - 2	26,4 b	CA - 2	29,0 b
0,2 mg - 3	40,0 b	CA - 3	33,0 b	0,2 mg - 3	32,2 b	CA - 3	32,0 b
0,2 mg - 4	36,0 b	CA - 4	40,6 b	0,2 mg - 4	33,0 b	CA - 4	29,6 b
0,4 mg - 1	40,0 b	CM - 1	37,0 b	0,4 mg - 1	30,0 b	CM - 1	27,8 b
0,4 mg - 2	36,0 b	CM - 2	33,0 b	0,4 mg - 2	28,4 b	CM - 2	31,0 b
0,4 mg - 3	40,0 b	CM - 3	33,6 b	0,4 mg - 3	30,0 b	CM - 3	29,2 b
0,4 mg - 4	37,0 b	CM - 4	41,2 b	0,4 mg - 4	31,4 b	CM - 4	29,0 b

FRAÇÃO ACETATO DE ETILA							
Radícula				Hipocótilo			
Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)
0,1 mg - 1	9,8 b	0,8 mg - 1	20,4 b	0,1 mg - 1	10,8 a	0,8 mg - 1	26,2 b
0,1 mg - 2	24,6 b	0,8 mg - 2	16,0 b	0,1 mg - 2	29,8 b	0,8 mg - 2	20,4 a
0,1 mg - 3	19,2 b	0,8 mg - 3	17,4 b	0,1 mg - 3	26,8 b	0,8 mg - 3	26,0 b
0,1 mg - 4	18,8 b	0,8 mg - 4	19,0 b	0,1 mg - 4	22,4 a	0,8 mg - 4	20,2 a
0,2 mg - 1	17,0 b	CA - 1	22,4 b	<u>0,2 mg - 1</u>	<u>21,6 a</u>	CA - 1	26,2 b
0,2 mg - 2	19,6 b	CA - 2	16,0 b	<u>0,2 mg - 2</u>	<u>19,0 a</u>	CA - 2	26,2 b
0,2 mg - 3	23,4 b	CA - 3	16,4 b	<u>0,2 mg - 3</u>	<u>21,8 a</u>	CA - 3	28,6 b
0,2 mg - 4	17,8 b	CA - 4	25,4 b	<u>0,2 mg - 4</u>	<u>22,4 a</u>	CA - 4	25,8 b
0,4 mg - 1	27,0 b	CM - 1	21,0 b	0,4 mg - 1	31,2 b	CM - 1	28,0 b
0,4 mg - 2	17,6 b	CM - 2	15,0 b	0,4 mg - 2	19,4 a	CM - 2	27,0 b
0,4 mg - 3	25,6 b	CM - 3	25,2 b	0,4 mg - 3	30,8 b	CM - 3	28,4 b
0,4 mg - 4	19,8 b	CM - 4	28,4 b	0,4 mg - 4	20,6 a	CM - 4	28,6 b

NOTAS: (1) CA = controle água e CM = controle metanol.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

TABELA 12- CRESCIMENTO DE *L. sativa* SUBMETIDA AS FRAÇÕES BUTANOL E HIDROALCOÓLICA DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALEOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO

FRAÇÃO BUTANOL							
Radícula				Hipocótilo			
Tratamento – repetição	Médias (mm)	Tratamento – repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)
0,1 mg – 1	21,8 b	0,8 mg – 1	17,0 b	0,1 mg – 1	30,2 b	0,8 mg – 1	19,6 a
0,1 mg – 2	24,8 b	0,8 mg – 2	21,4 b	0,1 mg – 2	30,4 b	0,8 mg – 2	27,8 b
0,1 mg – 3	23,8 b	0,8 mg – 3	20,6 b	0,1 mg – 3	27,2 b	0,8 mg – 3	24,4 b
0,1 mg – 4	21,0 b	0,8 mg – 4	23,2 b	0,1 mg – 4	28,4 b	0,8 mg – 4	24,8 b
0,2 mg – 1	21,0 b	CA – 1	22,4 b	0,2 mg – 1	24,0 b	CA – 1	26,2 b
0,2 mg – 2	23,0 b	CA – 2	16,0 b	0,2 mg – 2	24,4 b	CA – 2	26,2 b
0,2 mg – 3	23,0 b	CA – 3	16,4 b	0,2 mg – 3	27,0 b	CA – 3	28,6 b
0,2 mg – 4	21,6 b	CA – 4	25,4 b	0,2 mg – 4	24,0 b	CA – 4	25,8 b
0,4 mg – 1	23,4 b	CM – 1	21,0 b	0,4 mg – 1	29,0 b	CM – 1	28,0 b
0,4 mg – 2	27,8 b	CM – 2	15,0 b	0,4 mg – 2	28,0 b	CM – 2	27,0 b
0,4 mg – 3	15,0 b	CM – 3	25,2 b	0,4 mg – 3	19,0 a	CM – 3	28,4 b
0,4 mg – 4	11,6 b	CM – 4	28,4 b	0,4 mg – 4	11,2 a	CM – 4	28,6 b

FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA							
Radícula				Hipocótilo			
Tratamento – repetição	Médias (mm)	Tratamento – repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)	Tratamento - repetição	Médias (mm)
0,1 mg – 1	21,4 b	0,8 mg – 1	21,4 b	0,1 mg – 1	30,4 b	0,8 mg – 1	28,8 b
0,1 mg – 2	19,2 b	0,8 mg – 2	16,8 b	0,1 mg – 2	28,8 b	0,8 mg – 2	27,0 b
0,1 mg – 3	15,6 b	0,8 mg – 3	22,0 b	0,1 mg – 3	18,6 a	0,8 mg – 3	28,4 b
0,1 mg – 4	25,4 b	0,8 mg – 4	15,4 b	0,1 mg – 4	29,0 b	0,8 mg – 4	28,6 b
0,2 mg – 1	23,0 b	CA – 1	22,4 b	0,2 mg – 1	20,8 a	CA – 1	26,2 b
0,2 mg – 2	19,4 b	CA – 2	16,0 b	0,2 mg – 2	22,8 a	CA – 2	26,2 b
0,2 mg – 3	14,4 b	CA – 3	16,4 b	0,2 mg – 3	15,4 a	CA – 3	28,6 b
0,2 mg – 4	14,8 b	CA – 4	25,4 b	0,2 mg – 4	19,8 a	CA – 4	25,8 b
0,4 mg – 1	17,8 b	CM – 1	21,0 b	0,4 mg – 1	26,0 b	CM – 1	28,0 b
0,4 mg – 2	13,8 b	CM – 2	15,0 b	0,4 mg – 2	28,8 b	CM – 2	27,0 b
0,4 mg – 3	23,6 b	CM – 3	25,2 b	0,4 mg – 3	31,2 b	CM – 3	28,4 b
0,4 mg – 4	11,4 b	CM – 4	28,4 b	0,4 mg – 4	14,0 a	CM – 4	28,6 b

NOTAS: (1) CA = controle água e CM = controle metanol.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento (FERREIRA; AQUILA, 2000; ALVES *et al.*, 2011), o que explica os resultados apresentados neste trabalho. Ainda, se a espécie alvo tivesse degradado a substância tóxica em não tóxica, não haveria resultados tão expressivos no crescimento. O crescimento da radícula e do hipocótilo foi inibido pela amostra F12 com maior porcentagem de inibição. Esta inibição por parte da F12 provavelmente deu-se em razão da mistura de constituintes presentes nesta amostra.

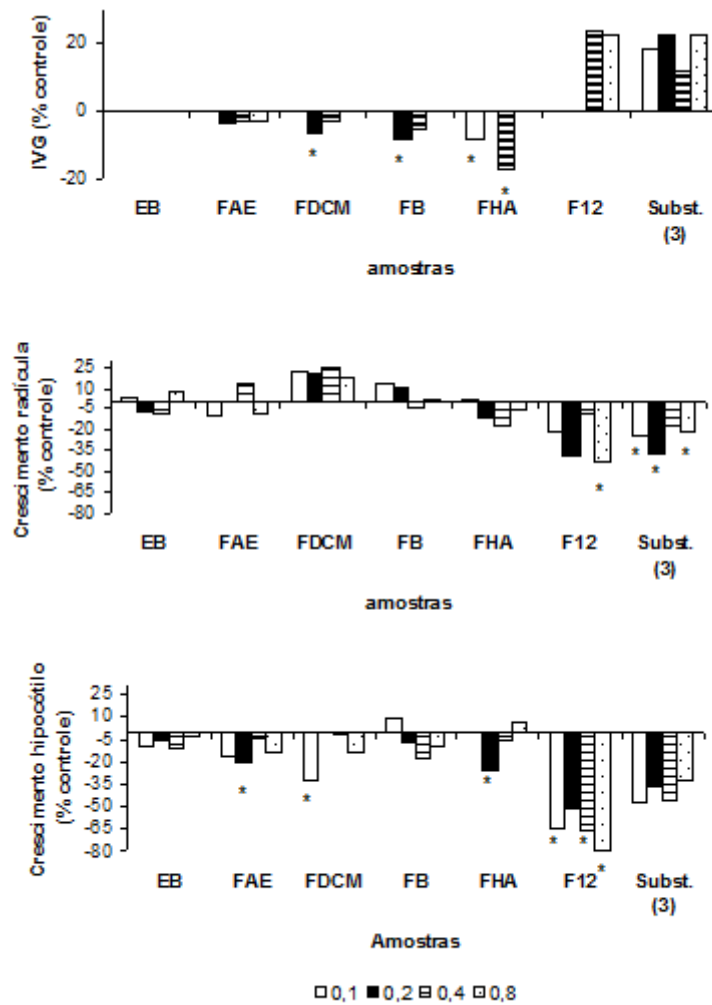


FIGURA 30 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* SUBMETIDA A AMOSTRAS DE *G. vellosii* PELO ENSAIO ALEOPÁTICO POR MEIO DE CAIXA DE POLIESTIRENO. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT.

4.3.2 Avaliação da atividade alelopática por meio de placa de Petri

4.3.2.1 Germinação e crescimento

O IVG e a porcentagem de germinação de *L. sativa* foram inibidos por 1000 mg L⁻¹ de EB, FAE, FDCM, FB e FHA. A inibição do IVG de *T. aestivum* ocorreu frente 1000, 500 e 250 mg L⁻¹ de EB, FDCM, FAE, FB e FHA, e a inibição da porcentagem de germinação ocorreu somente pela maior concentração de todas as amostras. Comparando a ação de todas as amostras testadas sobre a germinação das duas espécies alvo, a FB apresentou-se como a amostra mais fitotóxica (Tabela 13 e Figura 31).

O crescimento da radícula de *L. sativa* foi inibido por todas as amostras testadas em concentração de 1000 mg L⁻¹ com maior porcentagem de inibição pela FB e FDCM. O crescimento do hipocótilo foi inibido em maior concentração pela FDCM e FB, as quais inibiram em todas as concentrações.

Ao avaliar o peso seco, verifica-se compatibilidade com os resultados apresentados pelo crescimento do hipocótilo e da radícula, pois as frações mais fitotóxicas diminuíram a quantidade de massa das plântulas (Tabela 13 e Figura 32).

A FDCM em todas as concentrações inibiu o crescimento da radícula de *T. aestivum* apresentando dose dependência, porém, inibiu o crescimento do hipocótilo somente na maior concentração. As outras amostras também inibiram o crescimento da radícula, porém somente com 1000 mg L⁻¹. Ao comparar os resultados do crescimento da radícula aos resultados do crescimento do hipocótilo, verifica-se que a FB com 1000 mg L⁻¹ foi capaz de inibir os dois crescimentos em maior porcentagem. A FHA estimulou o crescimento do hipocótilo de *T. aestivum* em todas as concentrações, não ultrapassando 20%. Quanto ao peso seco, os resultados são compatíveis com os apresentados na germinação e crescimento, pois houve diminuição de massa das plântulas submetidas as FDCM e FB, ou seja, das amostras que mais influenciaram o crescimento da radícula e hipocótilo (Tabela 13 e Figuras 31 e 32).

TABELA 13 – GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE *L. sativa* E *T. aestivum* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALEOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI

ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	25,133 a	17,645 b	21,503 b	22,500 b	24,375 a	10,425 b	11,292 b	16,570 b
FAE	25,133 a	16,705 b	20,605 a	21,490 a	24,375 a	9,667 b	10,396 b	12,563 b
FDCM	25,133 a	18,585 b	21,300 a	21,640 a	24,375 a	11,684 b	13,715 b	16,751 b
FB	25,133 a	14,450 b	21,495 a	20,305 a	24,375 a	4,717 b	5,242 b	6,875 b
FHA	25,133 a	21,035 b	21,760 a	22,450 a	24,375 a	14,512 b	16,541 b	18,375 b
PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	94,500 a	79,000 b	80,000 a	84,000 a	99,500 a	67,000 b	70,500 a	78,500 a
FAE	94,500 a	72,000 b	82,500 b	86,500 b	99,500 a	54,500 b	61,000 a	71,500 a
FDCM	94,500 a	71,500 b	75,000 b	81,000 b	99,500 a	39,500 b	49,500 a	58,500 a
FB	94,500 a	64,500 b	71,000 b	79,000 b	99,500 a	29,000 b	37,000 a	43,500 a
FHA	94,500 a	75,000 b	80,000 a	84,000 a	99,500 a	63,500 b	71,000 a	80,000 a
CRESCIMENTO RADÍCULA (mm)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	17,600 a	10,550 b	11,550 b	15,500 b	33,375 a	16,850 b	17,300 a	20,150 a
FAE	17,600 a	11,150 b	11,700 a	13,500 a	33,375 a	16,025 b	16,775 a	18,600 a
FDCM	17,600 a	9,250 b	11,550 b	14,600 b	33,375 a	9,050 b	10,225 b	15,125 b
FB	17,600 a	7,475 b	11,375 b	13,525 b	33,375 a	5,575 b	10,725 a	12,625 a
FHA	17,600 a	11,250 b	13,650 a	16,300 a	33,375 a	17,325 b	21,400 a	24,475 a
CRESCIMENTO HIPOCÓTILO (mm)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	9,675 a	5,375 b	6,400 b	7,525 b	25,350 a	16,200 b	17,600 b	19,725 b
FAE	9,675 a	6,650 b	7,375 b	7,900 b	25,350 a	17,275 b	18,150 b	20,225 b
FDCM	9,675 a	4,425 b	6,175 b	7,250 b	25,350 a	13,650 b	15,250 a	17,175 a
FB	9,675 a	3,675 b	5,150 b	7,475 b	25,350 a	8,550 b	12,350 b	15,425 b
FHA	9,675 a	6,250 b	7,875 b	8,325 b	25,350 a	27,700 b	28,075 b	29,750 b
PESO SECO (g)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	0,021 a	0,021 a	0,026 a	0,027 a	0,045 a	0,044 b	0,044 a	0,044 a
FAE	0,021 a	0,020 b	0,020 a	0,022 a	0,045 a	0,042 b	0,043 b	0,042 b
FDCM	0,021 a	0,012 b	0,015 a	0,016 a	0,045 a	0,041 b	0,041 b	0,041 b
FB	0,021 a	0,016 b	0,018 a	0,021 a	0,045 a	0,040 b	0,043 a	0,042 a
FHA	0,021 a	0,016 b	0,019 a	0,019 a	0,045 a	0,045 b	0,046 b	0,046 b

NOTAS: (1) EB = extrato bruto; FAE = fração acetato de etila; FDCM = fração diclorometano; FB = fração butanol e FHA = fração hidroalcoólica.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

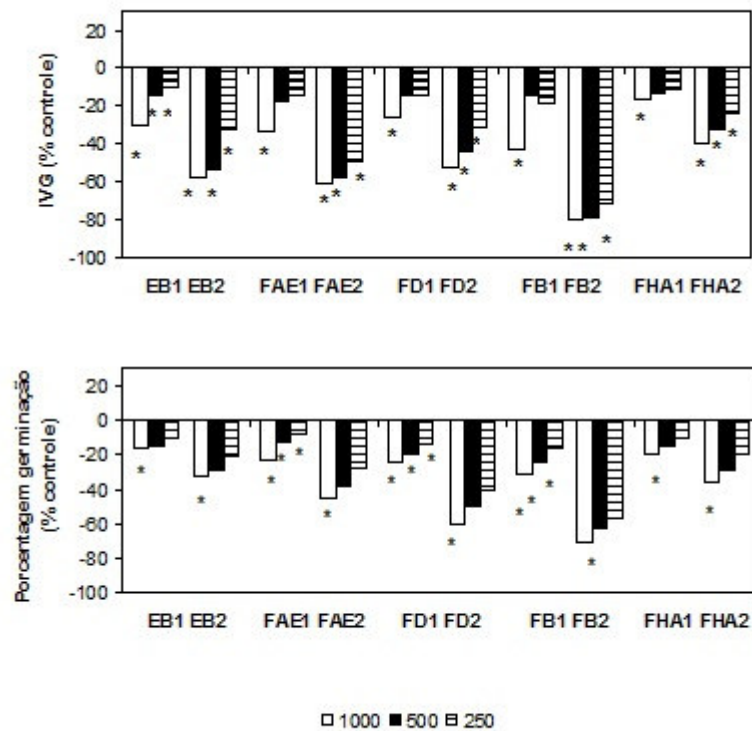


FIGURA 31 – GERMINAÇÃO DE *L. sativa* (1) E *T. aestivum* (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE *G. vellosii*. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.

O IVG, a porcentagem de germinação, crescimento da radícula e hipocótilo de *T. aestivum* foram inibidos em maior porcentagem em relação à outra espécie alvo, pela FDCM e FB. A influência visualizada pela FDCM e FB, provavelmente ocorreu devido as suas constituições, pois, conforme relato anterior, a FDCM possui as substâncias lupeol, sesamina e aspidospermina, e por meio de CCD verificou-se a presença de fenólicos na FB.

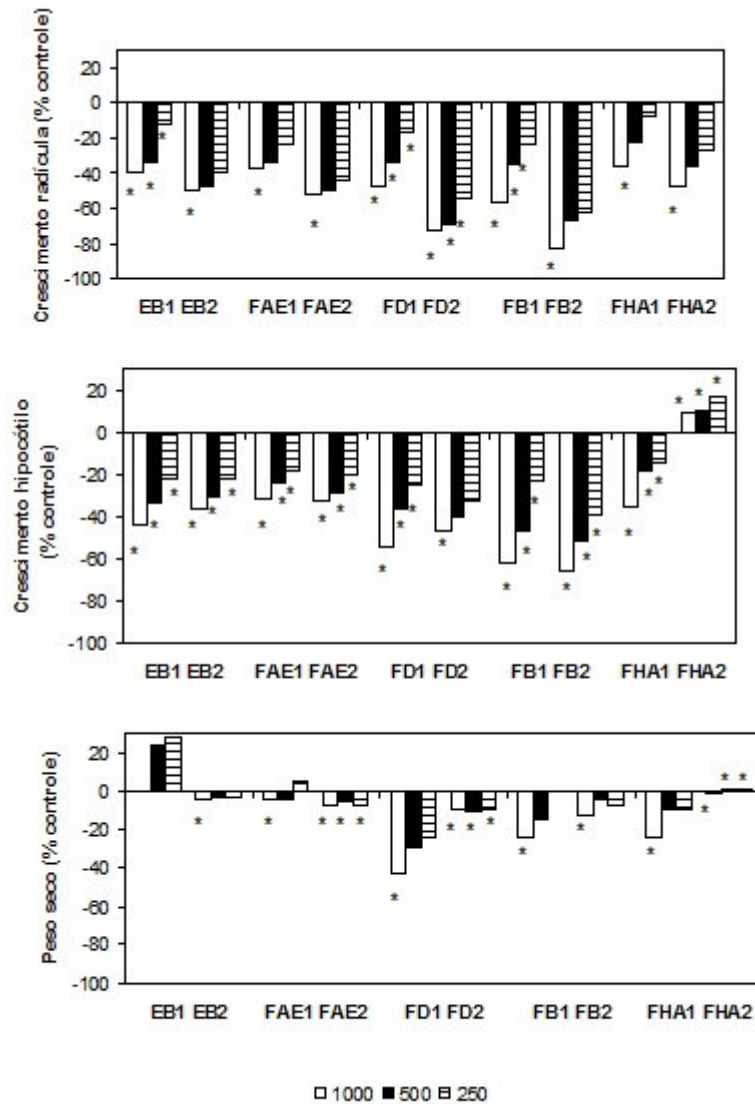


FIGURA 32 - CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* (1) E *T. aestivum* (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE *G. vellosii*. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.

O crescimento da radícula de *T. aestivum* foi influenciado em maior porcentagem em relação ao hipocótilo, e este resultado deve-se provavelmente pela sensibilidade do sistema radicular, pois, segundo Hoffmann *et al.* (2007) é mais sensível a ação dos aleloquímicos. A FHA estimulou o crescimento do hipocótilo de *T. aestivum* nas três concentrações testadas, porém inibiu o crescimento da radícula. Este resultado da FHA pode ser decorrente da presença de fitohormônios,

pois segundo Biswas *et al.* (2000), estas substâncias como auxina e etileno, estimulam o crescimento da planta dentro de uma faixa estreita de concentração, e fora desta faixa a planta não responde ou é inibida.

4.3.2.2 Teor de clorofila e respiração celular

A respiração potencial de *L. sativa* foi inibida por meio de todas as amostras em todas as concentrações, destacando-se as amostras FB e FDCM com maior influência. Ao avaliar o teor de clorofila total verifica-se que a maior porcentagem de inibição deu-se pelas amostras EB e FAE em todas as concentrações (Tabela 14 e Figura 33).

O teor de clorofila total e a respiração potencial de *T. aestivum* foram inibidos por todas as amostras na concentração de 1000 mg L⁻¹. A amostra FB foi a que apresentou maior porcentagem de inibição da respiração potencial nas concentrações de 1000, 500 e 250 mg L⁻¹ (Tabela 14 e Figura 33). Os flavonóides, conhecidos aleloquímicos (ALVES *et al.*, 2011) podem estar presentes nas amostras FAE e FB, conforme CCD realizada, o que provavelmente explica o resultado do teor de clorofila total das espécies *L. sativa* e *T. aestivum* para essas frações.

TABELA 14 – TEOR MÉDIO DE CLOROFILA TOTAL E RESPIRAÇÃO POTENCIAL DE *L. sativa* E *T. aestivum* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI

CLOROFILA TOTAL (mg L ⁻¹)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	9,227 a	6,633 b	7,367 b	7,767 b	18,963 a	10,160 b	12,507 a	14,393 a
FAE	9,227 a	6,900 b	6,433 b	6,767 b	18,963 a	8,270 b	11,080 a	15,320 a
FDCM	9,227 a	8,850 a	10,450 a	11,300 a	18,963 a	12,730 b	15,013 b	17,630 b
FB	9,227 a	12,200 b	10,267 a	7,400 a	18,963 a	5,437 b	8,520 a	12,833 a
FHA	9,227 a	8,367 a	8,200 a	8,800 a	18,963 a	14,860 b	16,440 b	17,413 a
RESPIRAÇÃO POTENCIAL (Absorbância 530 nm)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	1,334 a	0,750 b	0,797 b	0,880 b	2,385 a	1,009 b	1,317 a	1,543 a
FAE	1,334 a	0,930 b	0,913 b	1,024 b	2,385 a	0,926 b	1,120 a	1,534 a
FDCM	1,334 a	0,353 b	0,505 b	0,636 b	2,385 a	1,161 b	1,526 b	1,721 b
FB	1,334 a	0,219 b	0,330 b	0,435 b	2,385 a	0,691 b	0,814 b	0,944 b
FHA	1,334 a	1,132 b	1,213 b	1,315 b	2,385 a	1,128 b	1,318 a	1,824 a

NOTAS: (1) EB = extrato bruto; FAE = fração acetato de etila; FDCM = fração diclorometano; FB = fração butanol e FHA = fração hidroalcoólica.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

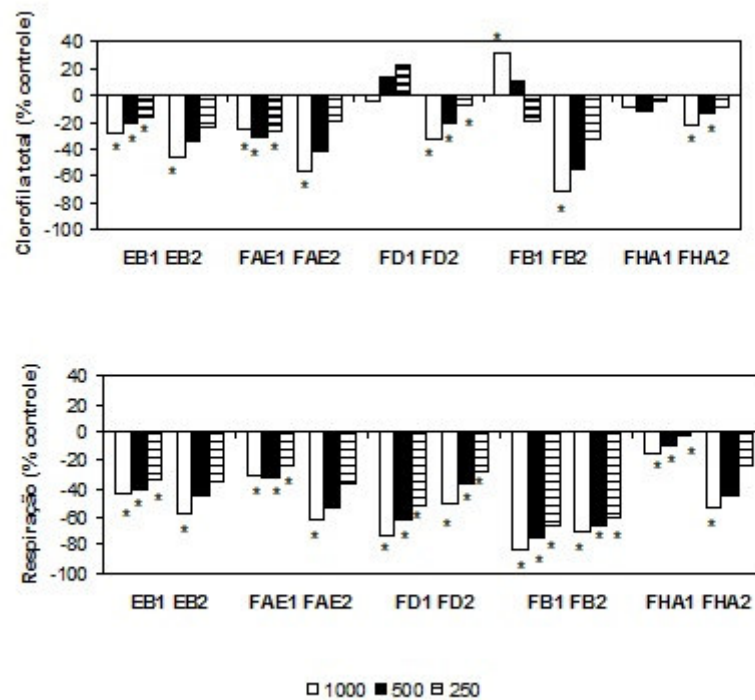


FIGURA 33 - TEOR MÉDIO DE CLOROFILA TOTAL E RESPIRAÇÃO POTENCIAL DE *L. sativa* (1) E *T. aestivum* (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE *G. vellosii*. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (p < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.

4.3.2.3 Atividade enzimática

Os resultados das amostras de *G. vellosii* sobre a atividade da α -amilase de *L. sativa* demonstram que esta enzima foi estimulada em maior porcentagem pela FB nas concentrações de 1000 e 500 mg L⁻¹ e pela FDCM em todas as concentrações. Na espécie *T. aestivum*, verifica-se que as amostras testadas também estimularam a α -amilase, com destaque para a FB e FAE em 1000 mg L⁻¹ (Tabela 15 e Figura 34).

A atividade da polifenoloxidase em *L. sativa* foi estimulada por todas as amostras com a concentração de 1000 mg L⁻¹. As atividades da peroxidase e a da catalase foram estimuladas em maior porcentagem por todas as concentrações das amostras FDCM e FB, respectivamente. A atividade da superóxido dismutase foi estimulada por todas as amostras em todas as concentrações, com exceção da FAE 500 e 250 mg L⁻¹. A ascorbato peroxidase foi estimulada pela FDCM e FAE em todas as concentrações (Tabela 15 e Figuras 34 e 35).

A atividade da polifenoloxidase em *T. aestivum* foi influenciada com inibição ou ativação por todas as amostras, onde a inibição foi obtida pela FHA em todas as concentrações, por 500 mg L⁻¹ de FDCM, 500 e 250 mg L⁻¹ de FAE e 250 mg L⁻¹ de EB. A maior porcentagem de ativação foi decorrente do EB em concentração de 1000 mg L⁻¹. Resultados diversificados podem ser verificados na atividade da superóxido dismutase, onde a FDCM e FHA inibiram em todas as concentrações, e o EB, FAE e FB estimularam com 1000 mg L⁻¹. A enzima catalase foi estimulada por todas as amostras na concentração de 1000 mg L⁻¹, sendo da amostra FB, em todas as concentrações a maior porcentagem de ativação. Todas as amostras influenciaram a atividade da peroxidase em *T. aestivum*, estimulando-a, porém em concentrações variadas, onde a FDCM estimulou em todas as concentrações e a FB somente com 1000 mg L⁻¹ e a FAE com 250 mg L⁻¹ (Tabela 15 e Figuras 34 e 35).

TABELA 15 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *L. sativa* E *T. aestivum* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALEOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI

PEROXIDASE (U min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína solúvel)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	6,500 a	12,133 b	10,767 b	9,200 b	8,757 a	31,383 b	27,400 b	20,993 b
FAE	6,500 a	15,433 b	12,467 b	10,900 b	8,757 a	46,957 a	45,477 a	47,630 b
FDCM	6,500 a	33,333 b	35,100 b	30,467 b	8,757 a	40,187 b	33,930 b	32,623 b
FB	6,500 a	23,040 a	20,850 a	24,650 b	8,757 a	50,710 b	44,513 a	38,367 a
FHA	6,500 a	5,267 b	4,533 b	2,767 b	8,757 a	21,800 b	18,533 a	16,477 a
CATALASE (μmol min ⁻¹ g ⁻¹ de material fresco)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	5,867 a	8,433 b	7,967 b	7,100 b	4,767 a	18,203 b	14,560 a	5,097 a
FAE	5,867 a	20,900 b	18,650 a	16,000 a	4,767 a	15,827 b	10,757 b	8,067 b
FDCM	5,867 a	19,150 b	15,250 a	8,550 a	4,767 a	21,707 b	13,037 a	8,160 a
FB	5,867 a	23,600 b	19,033 b	15,533 b	4,767 a	24,940 b	18,137 b	12,453 b
FHA	5,867 a	4,300 a	4,900 a	5,400 b	4,767 a	13,283 b	10,913 b	8,330 b
POLIFENOLOXIDASE (unidade de absorbância min ⁻¹ mg de proteína ⁻¹)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	0,790 a	2,050 b	1,437 b	0,710 a	2,417 a	2,797 b	2,483 a	2,183 b
FAE	0,790 a	2,453 b	1,757 b	1,073 b	2,417 a	2,447 a	1,877 b	1,983 b
FDCM	0,790 a	2,457 b	1,697 b	0,720 b	2,417 a	2,420 a	1,620 b	2,720 b
FB	0,790 a	3,143 b	2,740 b	2,057 b	2,417 a	2,713 b	2,510 a	1,530 b
FHA	0,790 a	1,120 b	0,803 a	0,720 a	2,417 a	1,707 b	1,410 b	1,080 b
α-AMILASE (μg de amido hidrolizado min ⁻¹ g de material fresco ⁻¹)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	6,127 a	13,567 b	12,353 b	9,353 b	1,320 a	10,990 b	10,443 b	3,000 b
FAE	6,127 a	8,483 b	6,487 a	6,207 a	1,320 a	17,333 b	9,373 b	4,110 b
FDCM	6,127 a	17,050 b	13,310 b	12,063 b	1,320 a	11,930 b	8,690 b	5,367 b
FB	6,127 a	18,833 b	14,907 b	7,463 a	1,320 a	22,370 b	5,220 b	5,193 b
FHA	6,127 a	10,363 b	8,983 b	6,367 a	1,320 a	6,603 b	5,360 a	2,810 a
SUPERÓXIDO DISMUTASE (U mg ⁻¹ de proteína)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	4,297 a	18,423 b	15,203 b	14,337 b	15,243 a	26,770 b	24,553 b	16,230 a
FAE	4,297 a	21,305 b	17,325 a	14,765 a	15,243 a	21,043 b	19,257 a	15,350 a
FDCM	4,297 a	16,247 b	15,160 b	13,140 b	15,243 a	10,683 b	8,467 b	5,350 b
FB	4,297 a	12,260 b	13,263 b	12,270 b	15,243 a	31,430 b	30,150 a	17,233 a
FHA	4,297 a	13,307 b	12,080 b	10,183 b	15,243 a	8,579 b	6,827 b	5,250 b
ASCORBATO PEROXIDASE (μmol de H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	16,970 a	34,180 b	31,300 a	29,175 a	25,137 a	33,197 b	30,330 a	28,140 a
FAE	16,970 a	40,287 b	38,340 b	34,347 b	25,137 a	33,113 b	25,140 a	23,167 b
FDCM	16,970 a	38,377 b	33,167 b	23,267 b	25,137 a	40,373 b	38,223 b	34,393 b
FB	16,970 a	45,150 a	40,215 a	31,245 b	25,137 a	40,807 b	34,330 b	30,350 b
FHA	16,970 a	23,145 a	20,140 a	17,185 a	25,137 a	30,280 b	29,967 b	28,337 b
PROTEÍNAS TOTAIS (mg g ⁻¹)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	136,590 a	194,450 b	178,140 b	154,897 b	185,583 a	242,957 b	222,083 b	216,417 b
FAE	136,590 a	221,620 b	198,880 a	186,623 a	185,583 a	248,750 b	245,590 b	194,500 b
FDCM	136,590 a	239,897 b	216,673 a	196,003 a	185,583 a	285,287 b	237,833 b	203,917 b
FB	136,590 a	298,867 b	233,480 b	217,737 b	185,583 a	280,023 b	230,237 b	217,333 b
FHA	136,590 a	199,340 b	156,620 b	138,800 b	185,583 a	210,917 b	198,917 b	182,417 a

NOTAS: (1) EB = extrato bruto; FAE = fração acetato de etila; FDCM = fração diclorometano; FB = fração butanol e FHA = fração hidroalcoólica.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

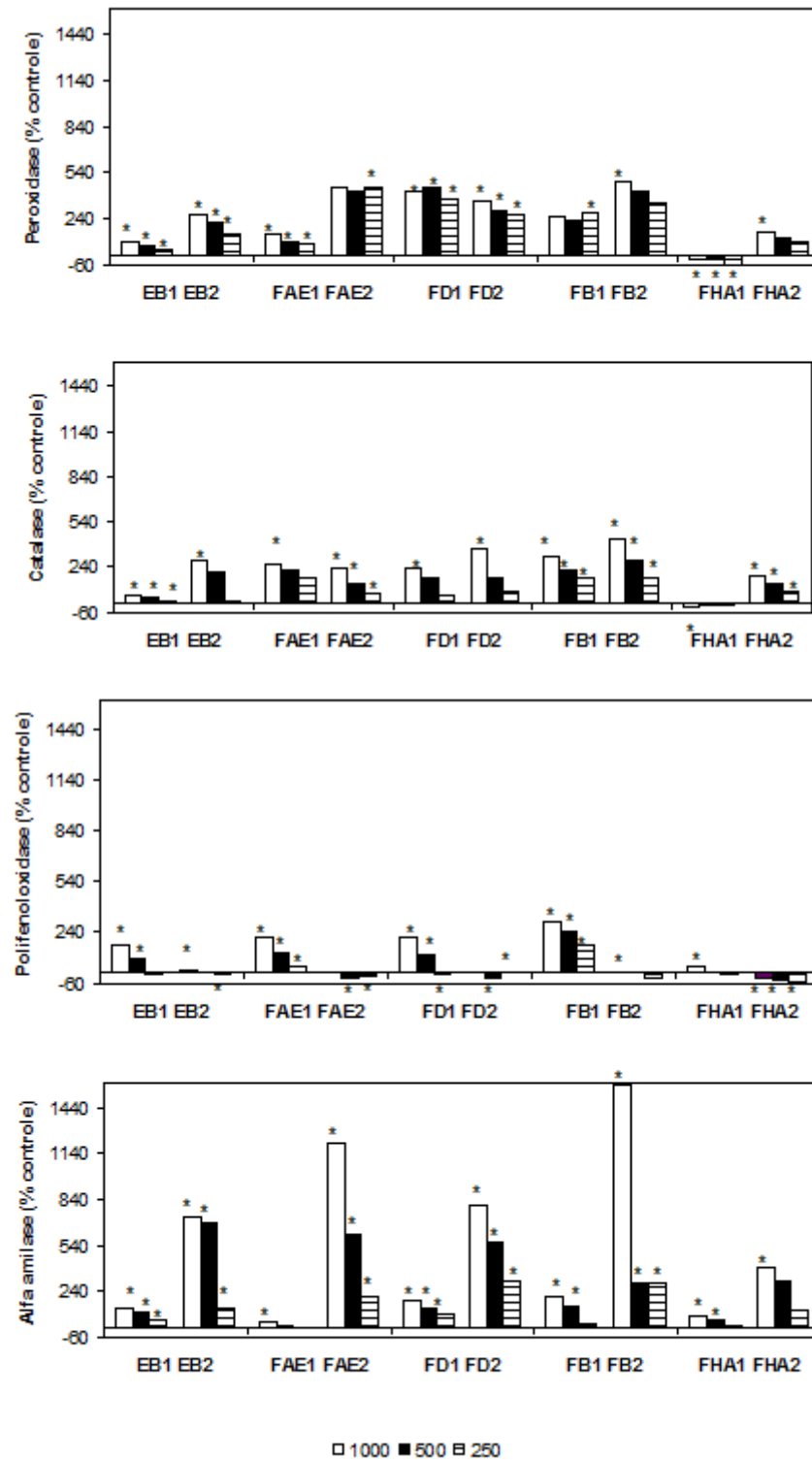


FIGURA 34 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS PEROXIDASE, CATALASE, POLIFENOLOXIDASE E α -AMILASE DE *L. sativa* (1) E *T. aestivum* (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE *G. vellosii*. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.

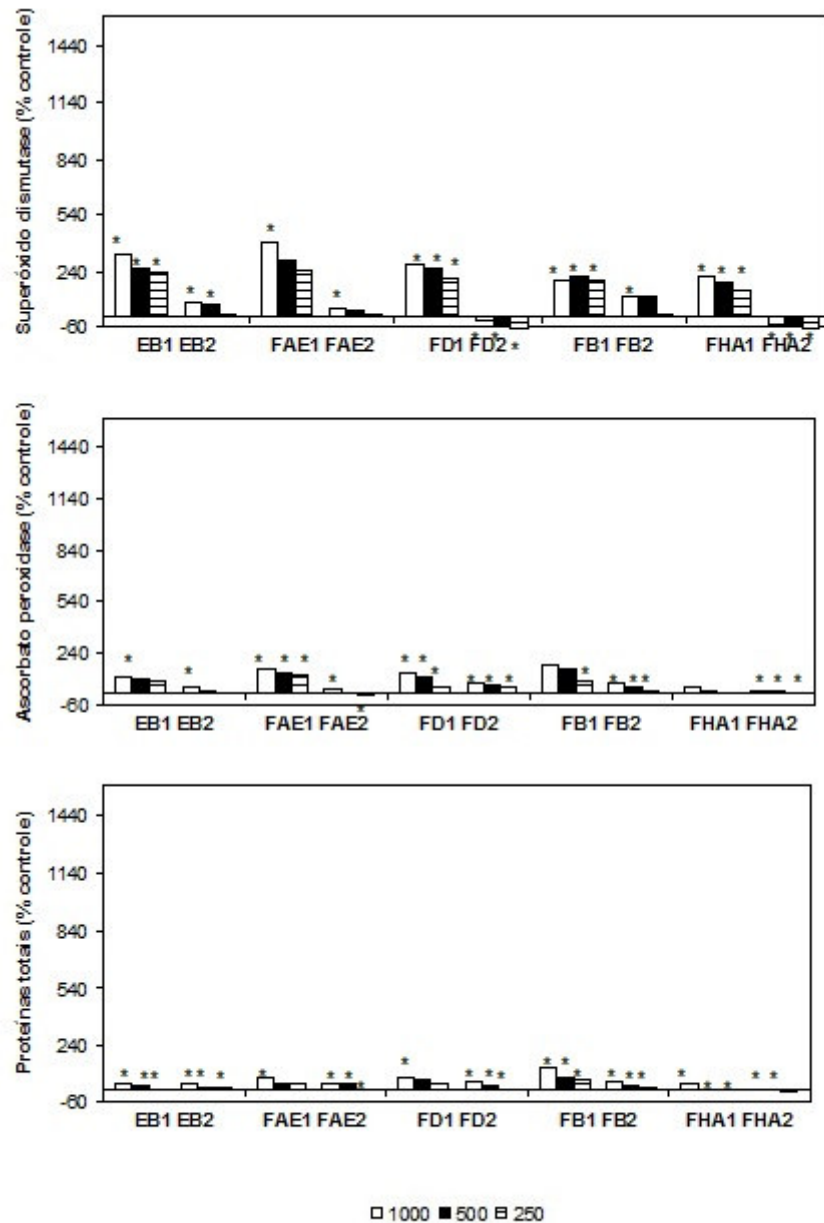


FIGURA 35 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE, ASCORBATO PEROXIDASE E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE *L. sativa* (1) E *T. aestivum* (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE *G. vellosii*. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.

A atividade da ascorbato peroxidase em *T. aestivum* foi estimulada pela FDCM e FB em todas as concentrações e as outras amostras (EB, FAE e FHA) também estimularam esta enzima, porém na concentração de 1000 mg L⁻¹. Apenas a FAE, na concentração de 250 mg L⁻¹, inibiu a atividade da ascorbato peroxidase (Tabela 15 e Figuras 34 e 35).

Neste trabalho, a quantificação das proteínas totais que refletem a quantidade de enzimas produzidas, confirmou os resultados apresentados pela atividade enzimática, pois todas as amostras aumentaram a quantidade de proteínas totais (Tabela 15 e Figura 35).

A atividade da α -amilase de *T. aestivum* foi estimulada em maior porcentagem ao comparar com a atividade da α -amilase de *L. sativa*. A FB na concentração de 1000 mg mL⁻¹ aumentou a α -amilase de *T. aestivum* em mais de 1400% em relação ao controle. Esta enzima é sintetizada durante as primeiras fases da germinação, com energia proveniente da respiração (CARVALHO, NAKAGAWA, 1988). Estes resultados são compatíveis com os resultados da germinação e respiração, ao considerar que o aumento da atividade desta enzima pode estar relacionado a um aumento de gasto energético por parte das células para a defesa da espécie alvo.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser estimulada pelos aleloquímicos por meio de mecanismos que doam elétrons ao oxigênio para formar o superóxido, como o bloqueio da cadeia transportadora de elétrons; a formação de um composto derivado das quinonas, altamente reativo, e pela atividade sobre a enzima NADPH oxidase. Com o aumento de EROs, a espécie vegetal aumenta a produção de enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase e polifenoloxidase, provavelmente como defesa contra ação citotóxica destas espécies reativas (CAMPOS *et al.*, 2004; SOARES; MACHADO, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008). Todas as amostras influenciaram a produção das enzimas superóxido dismutase, catalase, polifenoloxidase e ascorbato peroxidase nas espécies alvo, com destaque para FDCM e FB.

A atividade da peroxidase é inversalmente proporcional ao crescimento (CAMARGO *et al.*, 2000). Como a FDCM e FB aumentaram em maior porcentagem a quantidade desta enzima nas duas espécies alvo, estes resultados estão de acordo com os do crescimento, onde o crescimento do hipocótilo e da radícula foi

inibido em maior porcentagem pelas referidas frações. Esta enzima também pode ser utilizada como modelo para estudos do controle hormonal e processos de envelhecimento das espécies vegetais e estar relacionada a peroxidação de lipídios (CAMARGO *et al.*, 2000). O aumento da peroxidase é proporcional a resistência das espécies vegetais a doenças e pode ser resultante da adaptação da planta frente a condições adversas que geram estresse (SOARES; MARINGONI; LIMA, 2004).

O estresse oxidativo em sistemas biológicos é originado como resultado de um desequilíbrio entre a geração de espécies oxidativas e as defesas celulares antioxidantes (ALPER *et al.*, 1998) e a fitotoxicidade de uma planta sobre outra pode ser pelo estresse oxidativo, ou seja, pela ativação do mecanismo antioxidante (SINGH *et al.*, 2006; BOGATEK; GNIAZDOWSKA, 2007; CRUZ-ORTEGA; LARA-NÚÑEZ; ANAYA, 2007). Sendo assim, estes resultados demonstram como as amostras testadas podem ocasionar estresse oxidativo sobre *L. sativa* e *T. aestivum*.

O teor de proteínas totais das duas espécies alvo também foi aumentado pelas amostras testadas. Segundo Viecegli *et al.* (2010) o teor de proteínas aumentado corresponde à ativação de mecanismos de defesa da espécie vegetal o que caracteriza uma fase de resistência do vegetal.

Os dados obtidos por meio dos ensaios na placa de Petri demonstram a complexidade dos agentes aleloquímicos. O “estresse aleloquímico” (PERGO; ISHII-IWAMOTO, 2011) provocado por estes agentes desencadeiam mecanismos de defesa na espécie alvo influenciando a germinação, crescimento, respiração potencial, teor de clorofila total, atividade enzimática e índice mitótico.

4.3.2.4 Índice mitótico radicular

O número total de células de *L. sativa* foi inibido por todas as amostras em todas as concentrações testadas. A prófase foi inibida por todas as amostras em todas as concentrações, com exceção da FHA. A metáfase, anáfase e telófase foram inibidas por todas as amostras em 1000 mg mL⁻¹, com exceção da FAE e

destacando-se a FDCM e FB que apresentaram maior porcentagem de inibição (Tabela 16 e Figuras 36 e 37).

A quantidade total de células e a prófase de *T. aestivum* foram inibidas em presença de todas as amostras em todas as concentrações. A metáfase, anáfase e telófase também foram inibidas por todas as amostras em variadas concentrações. Em todas as fases da divisão mitótica verifica-se que a FB foi a que mais influenciou na divisão mitótica de *T. aestivum*, inibindo-a (Tabela 16 e Figuras 36 e 37).

TABELA 16 – ÍNDICE MITÓTICO RADICULAR DE *L. sativa* E *T. aestivum* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI

NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	233,000 a	77,667 b	105,667 b	121,667 b	245,667 a	115,667 b	166,000 b	198,333 b
FAE	233,000 a	164,000 b	187,667 b	213,667 b	245,667 a	98,667 b	125,000 b	154,333 b
FDCM	233,000 a	173,667 b	185,000 b	195,667 b	245,667 a	67,333 b	97,667 b	112,667 b
FB	233,000 a	86,667 b	99,000 b	113,333 b	245,667 a	66,667 b	90,333 b	98,333 b
FHA	233,000 a	196,667 b	214,667 b	222,667 b	245,667 a	121,667 b	166,333 b	223,667 b
PRÓFASE								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	165,667 a	77,333 b	105,667 b	121,333 b	178,000 a	77,667 b	87,333 b	116,333 b
FAE	165,667 a	122,667 b	132,000 b	146,667 b	178,000 a	43,667 b	61,667 b	84,667 b
FDCM	165,667 a	106,667 b	112,667 b	123,333 b	178,000 a	23,333 b	46,667 b	56,333 b
FB	165,667 a	73,333 b	87,667 b	101,333 b	178,000 a	17,333 b	34,000 b	46,000 b
FHA	165,667 a	122,000 a	194,000 a	213,500 a	178,000 a	92,667 b	122,000 b	155,667 b
METÁFASE								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	34,333 a	2,000 b	7,667 b	14,667 b	46,667 a	15,667 b	25,333 b	33,333 b
FAE	34,333 a	14,000 a	25,333 b	31,667 b	46,667 a	11,333 b	21,333 b	31,000 b
FDCM	34,333 a	2,333 b	4,333 b	9,667 b	46,667 a	13,333 b	8,667 a	13,333 a
FB	34,333 a	1,333 b	2,333 b	6,333 b	46,667 a	2,000 b	5,667 b	9,333 b
FHA	34,333 a	11,333 b	14,333 b	21,667 b	46,667 a	18,333 b	28,667 b	37,000 b
ANÁFASE								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	21,333 a	2,667 b	8,000 b	14,333 b	46,667 a	18,333 b	28,000 b	37,000 b
FAE	21,333 a	4,000 b	8,500 a	17,000 a	46,667 a	11,333 b	21,333 b	31,000 b
FDCM	21,333 a	2,667 b	3,667 b	8,667 b	46,667 a	6,333 b	8,667 a	13,333 a
FB	21,333 a	0,667 b	2,667 b	4,667 b	46,667 a	1,333 b	4,333 b	8,667 b
FHA	21,333 a	4,000 b	9,500 a	16,500 a	46,667 a	15,667 b	25,333 b	33,333 b
TELOFASE								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	11,000 a	1,333 b	3,333 b	5,667 b	13,333 a	3,333 b	5,000 b	11,000 a
FAE	11,000 a	4,667 b	6,000 b	8,667 b	13,333 a	2,667 b	4,333 b	7,000 b
FDCM	11,000 a	5,333 b	3,333 b	0,667 b	13,333 a	1,000 b	3,667 b	5,667 b
FB	11,000 a	0,500 b	2,500 a	3,500 a	13,333 a	0,333 b	1,667 b	4,333 b
FHA	11,000 a	3,667 b	5,667 b	8,333 b	13,333 a	4,333 b	6,667 b	11,333 a

NOTAS: (1) EB = extrato bruto; FAE = fração acetato de etila; FDCM = fração diclorometano; FB = fração butanol e FHA = fração hidroalcoólica.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

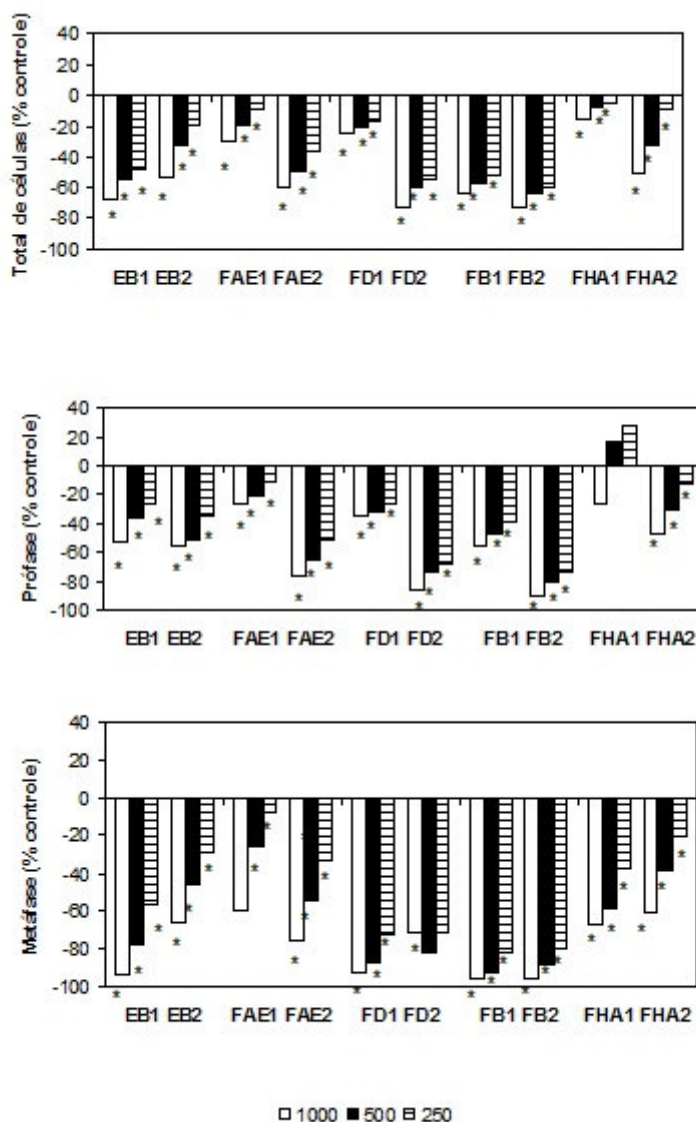


FIGURA 36 – ÍNDICE MITÓTICO RADICULAR (NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS, PRÓFASE E METÁFASE) DE *L. sativa* (1) E *T. aestivum* (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE *G. vellosii*. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE (P < 0,05) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.

O crescimento do eixo embrionário dá-se pelo aumento de suas células e multiplicação por meio de divisões mitóticas (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988), portanto, a redução do crescimento está associada à inibição da mitose (ALMEIDA *et al.*, 2008). Neste trabalho foi verificada a redução do crescimento radicular e do hipocótilo das espécies alvo pelas amostras FDCM e FB de *G. vellosii*, e a inibição da divisão mitótica em todas as suas fases pelas mesmas amostras.

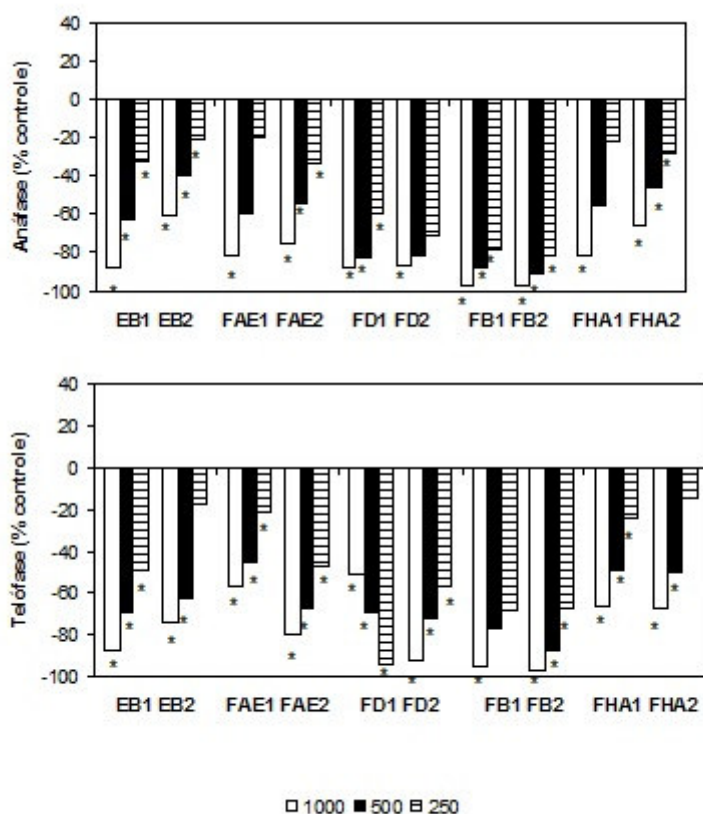


FIGURA 37 – ÍNDICE MITÓTICO RADICULAR (ANÁFASE E TELÓFASE) DE *L. sativa* (1) E *T. aestivum* (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE *G. vellosii*. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.

4.3.2.5 Reversibilidade

O ensaio de recuperação ou reversibilidade é utilizado para verificação da recuperação da planta à retomada do crescimento após contato com amostras com possível atividade alelopática, ou seja, verificação da capacidade da espécie alvo em reverter a influência sofrida por substâncias fitotóxicas.

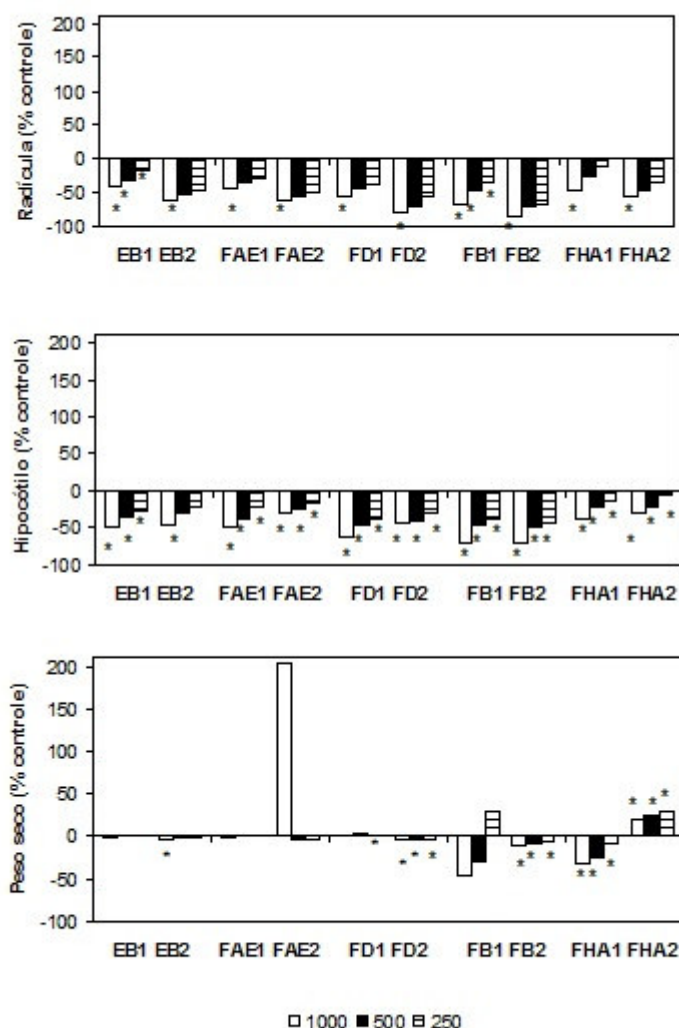


FIGURA 38 – REVERSIBILIDADE DE *L. sativa* (1) E *T. aestivum* (2) SUBMETIDAS A 1000, 500 E 250 mg L⁻¹ DE EB, FAE, FD, FB E FHA DE *G. vellosii*. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE TUKEY.

Ao avaliar a capacidade de recuperação das plântulas de *L. sativa* e *T. aestivum* após contato com as amostras, verifica-se que as mesmas não apresentaram reversibilidade. Estes resultados demonstraram que as espécies alvo não foram capazes de recuperar o crescimento da radícula e do hipocótilo após contato com amostras de *G. vellosii* (Tabela 17 e Figura 38).

Ao comparar os resultados da reversibilidade aos apresentados no ensaio

do crescimento, verifica-se que todas as amostras na concentração de 1000 mg mL⁻¹ influenciaram as duas espécies alvo, com a FDCM e FB em maior porcentagem.

TABELA 17 – REVERSIBILIDADE DE *L. sativa* E *T. aestivum* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *G. vellosii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACA DE PETRI

CRESCIMENTO RADÍCULA (mm)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	19,575 a	11,550 b	13,500 b	16,625 b	30,608 a	12,278 b	14,383 a	16,173 a
FAE	19,575 a	10,650 b	12,450 a	13,900 a	30,608 a	12,293 b	13,368 a	15,440 a
FDCM	19,575 a	8,750 b	11,450 a	12,350 a	30,608 a	6,673 b	8,855 a	13,280 a
FB	19,575 a	6,425 b	10,325 b	12,525 b	30,608 a	4,465 b	8,525 a	10,260 a
FHA	19,575 a	10,200 b	14,500 a	17,250 a	30,608 a	13,218 b	16,185 a	20,235 a
CRESCIMENTO HIPOCÓTILO (mm)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	8,575 a	4,325 b	5,500 b	6,325 b	22,375 a	12,313 b	15,455 a	17,333 a
FAE	8,575 a	4,400 b	5,400 b	6,600 b	22,375 a	15,463 b	16,580 b	18,660 b
FDCM	8,575 a	3,225 b	4,450 b	5,275 b	22,375 a	12,745 b	13,288 b	15,590 b
FB	8,575 a	2,500 b	4,525 b	5,450 b	22,375 a	6,535 b	11,435 b	12,583 b
FHA	8,575 a	5,425 b	6,775 b	7,375 b	22,375 a	15,535 b	17,665 b	20,733 b
PESO SECO (g)								
AMOSTRA	<i>Lactuca sativa</i>				<i>Triticum aestivum</i>			
	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹	Controle	1000 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	250 mg L ⁻¹
EB	0,022 a	0,022 a	0,022 a	0,022 a	0,032 a	0,032 b	0,032 a	0,032 a
FAE	0,022 a	0,022 a	0,022 a	0,022 a	0,032 a	0,098 a	0,031 a	0,031 a
FDCM	0,022 a	0,022 a	0,023 a	0,022 b	0,032 a	0,031 b	0,031 b	0,031 b
FB	0,022 a	0,012 a	0,016 a	0,029 a	0,032 a	0,029 b	0,030 b	0,030 b
FHA	0,022 a	0,015 b	0,017 b	0,020 b	0,032 a	0,039 b	0,041 b	0,042 b

NOTAS: (1) EB = extrato bruto; FAE = fração acetato de etila; FDCM = fração diclorometano; FB = fração butanol e FHA = fração hidroalcoólica.

(2) Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

4.3.3 Avaliação da atividade alelopática por meio de cromatoplaça

No ensaio alelopatográfico, 0,8 mg dos constituintes isolados inibiu o crescimento do hipocótilo e da radícula de *L. sativa*. As amostras testadas apresentaram maior influência sobre o hipocótilo ao comparar com a radícula (Tabela 18 e Figura 39).

TABELA 18 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE *L. sativa* EM ENSAIO ALELOPATOGRAFICO COM AMOSTRAS DE *G. vellosii*

AMOSTRA	GERMINAÇÃO (IVG)		CRESCIMENTO			
	CONTROLE	0,8 mg	RADÍCULA		HIPOCÓTILO	
			CONTROLE	0,8 mg	CONTROLE	0,8 mg
SUBSTÂNCIA (1)	7,7	7,7	25,70 a	16,90 b	32,80 a	15,60 b
F12	9,5	9,0	13,00 a	14,20 b	23,10 a	14,30 b
SUBSTÂNCIA (3)	9,5	9,5	13,00 a	12,60 b	23,10 a	13,10 b

NOTA: Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

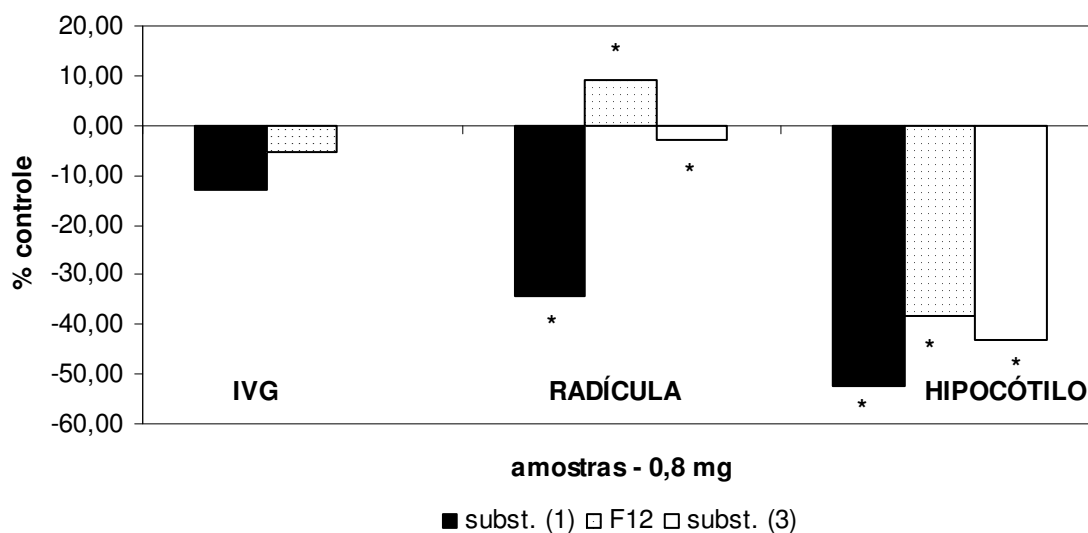


FIGURA 39 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* SUBMETIDAS A 0,8 mg DE (1), F12 E (3) PROVENIENTES DE *G. vellosii* PELO ENSAIO ALELOPATOGRAFICO. DADOS EXPRESSOS EM PORCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. * A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($p < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT.

Entre as amostras testadas, a substância **(1)**, identificada como lupeol, foi a que mais inibiu o crescimento da radícula e do hipocótilo de *L. sativa* ao compará-la ao controle. Ferreira e Áquila (2000) já citaram os terpenóides como aleloquímicos e Luz *et al.* (2010) verificou a atividade alelopática do lupeol isolado de *Acacia mangium* sobre as plantas daninhas *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*.

A substância **(3)**, identificada como aspidospermina, também inibiu o crescimento da radícula e do hipocótilo de *L. sativa*. Muitas teorias têm sido formuladas para explicar a ação dos metabólitos secundários nos organismos vegetais, particularmente os alcaloides. Uma das hipóteses sugere que os alcaloides atuariam como hormônios reguladores de crescimento, provavelmente inibidores da germinação em decorrência do seu poder quelante e/ou citotóxico (SIMÕES *et al.*, 2000). A atividade alelopática por parte de alcaloides como escopolamina, hiosciamina, hordenina (LIU; LOVETT, 1993), gramina (LIU; LOVETT, 1993; BRAVO *et al.*, 2010) triptamina, metoxi-triptamina, metoxi-dimetil triptamina, e metiltriptamina (BRAVO *et al.*, 2010), já foi relatada.

A amostra F12, da qual foi purificada a sesamina **(2)**, também apresentou atividade alelopática. A atividade apresentada pode ser resultante desta substância, pois, segundo Rios, Giner e Prieto (2002), algumas lignanas podem apresentar atividade alelopática devido ao grupo metilenodióxido.

A diferença de resultados entre este ensaio e o ensaio alelopático por meio de caixa de poliestireno, pode ser explicada pela sensibilidade do método, pois ao utilizar cromatoplaça as sementes ficam em contato direto com a amostra.

A ação direta de agentes aleloquímicos entre plantas (OLIVEROS-BASTIDAS *et al.*, 2009) foi avaliada pelos ensaios alelopáticos realizados neste trabalho, ou seja, as amostras oriundas de *G. vellosii* interferiram nas espécies alvo *L. sativa* e *T. aestivum*.

4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

No ensaio de disco difusão não foi verificada a inibição do crescimento das bactérias testadas. Porém, a hidrofília dos constituintes químicos é determinante para este ensaio, pois, segundo Romeiro (2001), um meio semissólido, o qual contenha ágar como agente solidificante, é um gel perfeito. Sendo assim, os resultados negativos podem ser devido a características lipofílicas das amostras de *G. vellosii* (Tabela 19).

No ensaio bioautográfico a fração diclorometano inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. typhimurium*. A substância **(3)** inibiu o crescimento de *S. epidermidis* e *S. typhimurium* (Tabela 19). Oliveira (1999) testou a (-)-aspidospermina sobre *B. subtilis*, *E. coli* e *S. aureus* por autobiograma, e verificou a atividade antimicrobiana somente sobre *B. subtilis* utilizando 50 µg de uma solução 5 mg mL⁻¹.

Neste trabalho, no ensaio bioautográfico, foi verificada que a capacidade de inibição bacteriana da FDCM é superior a substância pura, provavelmente devido ao sinergismo das substâncias presentes na respectiva fração.

No ensaio de microdiluição verificou-se que 1000 µg mL⁻¹ de extrato bruto e 200 µg mL⁻¹ de fração butanol inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* (Tabela 19). Tanaka *et al.* (2006) testaram o extrato metanólico de *Aspidosperma ramiflorum* contra *S. aureus* por meio da concentração inibitória mínima e verificaram ação antibacteriana com 500 µg mL⁻¹, resultado também considerado moderado pelos autores.

TABELA 19 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *G. vellosii*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (µg)	DISCO DIFUSÃO - MÉDIA DO DIÂMETRO DOS HALOS DE INIBIÇÃO EM mm (subtraindo 6 mm dos discos)				
		MICROORGANISMO				
		Sa 1	Ec 1	Se	Pa 1	St
EB	500	0	0	0	0	0
EB	1000	0	0	0	0	0
FDCM	500	0	0	0	0	0
FDCM	1000	0	0	0	0	0
FAE	500	0	0	0	0	0
FAE	1000	0	0	0	0	0
FB	500	0	0	0	0	0
FB	1000	0	0	0	0	0
FHA	500	0	0	0	0	0
FHA	1000	0	0	0	0	0
F12	60	0	0	0	0	0
F12	200	0	0	0	0	0
(3)	60	0	0	0	0	0
(3)	200	0	0	0	0	0
Cloranfenicol	30	21,3	21,5	36,4	9,3	24,6
Clorofórmio		0	0	0	0	0
Metanol		0	0	0	0	0

AMOSTRA	BIOAUTOGRAFIA				
	MICROORGANISMO				
	Sa 1	Ec 1	Se	Pa 1	St
FDCM	inibiu	inibiu	inibiu	NEG	inibiu
F12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
(3)	NEG	NEG	inibiu	NEG	inibiu
Controle fase móvel	+	+	+	+	+
Controle Cloranfenicol	inibiu	inibiu	inibiu	inibiu	inibiu

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg mL ⁻¹)							
	MICROORGANISMO							
	Sa 2	Sa 3	Ec 2	Ec 3	Pa 2	Ef 1	Ef 2	Kp
EB	1000	1000	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
FDCM	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
FAE	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
FB	NEG	200	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
FHA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
F12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
(3)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Controle coluna 1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Controle coluna 11	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle coluna 12	+	+	+	+	+	+	+	+

NOTA: Sa 1 = *Staphylococcus aureus* ATCC® 6358; Sa 2 = *Staphylococcus aureus* ATCC® 25913; Sa 3 = *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923; Ec 1 = *Escherichia coli* ATCC® 25022; Ec 2 = *Escherichia coli* ATCC® 25922; Ec 3 = *Escherichia coli* ATCC® 35218; Se = *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228; Pa 1 = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853; Pa 2 = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853; St = *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028; Ef 1 = *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212; Ef 2 = *Enterococcus faecalis* ATCC® 5129; Kp = *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603; + = crescimento de microrganismo; NEG = resultado negativo, nenhum crescimento de microrganismos; inibiu = presença de halo de inibição; EB = extrato bruto etanólico; FDCM = fração diclorometano; FAE = fração acetato de etila; FB = fração butanol; FH = fração hidroalcoólica; F12 e (3) = constituintes isolados.

4.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio

A Figura 40 apresenta os resultados do ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio os quais demonstraram que a substância **(3)** é mais ativa que a rutina, porém menos ativa que o ácido ascórbico. Ao comparar com 60 µg de rutina, que foi considerada como 100% de capacidade antioxidante, 50 e 60 µg da substância **(3)** apresentaram em torno de 123% de capacidade antioxidante, ou seja 23% a mais que a rutina. Em relação ao ácido ascórbico, 60 µg de substância **(3)**, a maior concentração utilizada, apresentou somente 38,21% de atividade antioxidante, representando em torno de 60% a menos da capacidade antioxidante do ácido ascórbico.

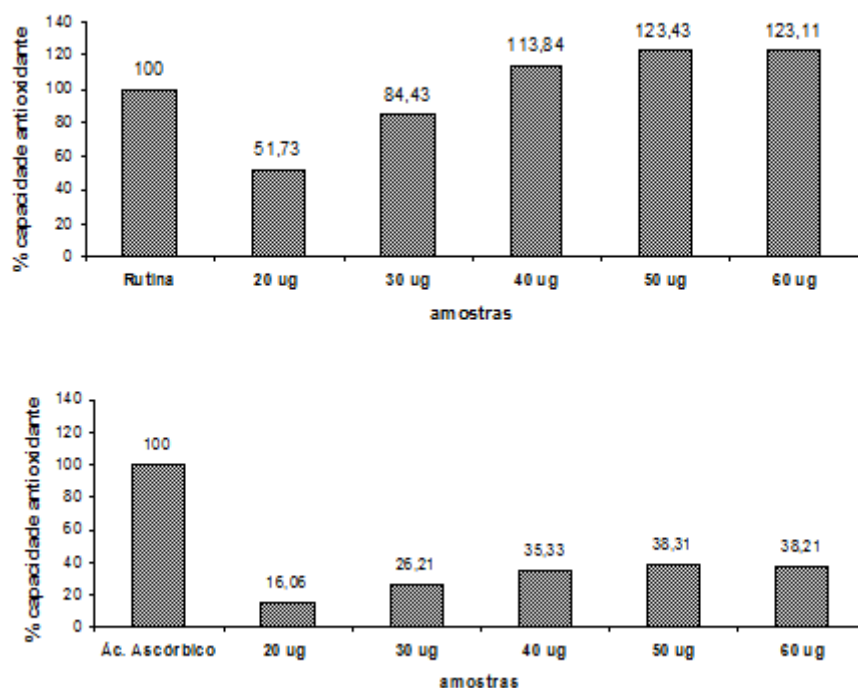


FIGURA 40 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DA SUBSTÂNCIA **(3)** PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A RUTINA E ÁCIDO ASCÓRBICO

4.5.2 Ensaio antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas (TBARS)

Com base nos dados obtidos pelo ensaio antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas (Tabela 20), pode-se supor que nas concentrações testadas (100, 500 e 1000 ppm), a substância **(3)** apresenta atividade antioxidante semelhante ao BHT e ao ácido ascórbico. O BHT foi utilizado como controle positivo, pois, segundo Ramalho e Jorge (2006), o mesmo é um antioxidante sintético utilizado em alimentos.

TABELA 20 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO-ESPECIES REATIVAS

CONCENTRAÇÃO (ppm)	AMOSTRA		
	BHT	ÁCIDO ASCÓRBICO	SUBSTÂNCIA (3)
	IA (%)	IA (%)	IA (%)
100	10,73 ± 0,59 ab	3,67 ± 0,70 a	8,10 ± 4,81 a
500	20,25 ± 1,07 b	14,87 ± 1,44 ab	10,10 ± 2,68 ab
1000	35,16 ± 3,42 c	21,73 ± 1,77 b	34,59 ± 12,23 c

NOTAS: (1) IA (%) = Índice Antioxidante, média dos três experimentos.

(2) Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

4.5.3 Potencial antioxidante pela atividade das enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase

Neste ensaio, os controles positivos escolhidos foram o acetato de tocoferol e o ácido ascórbico devido a suas propriedades antioxidantes. O tocoferol é inibidor da peroxidação lipídica *in vivo* ao doar hidrogênio ao radical peroxila interrompendo a reação radicalar (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006) e Alper *et al.* (1998) verificou que o tocoferol aumentou a atividade da catalase em tecido renal e cardíaco de ratos. O ascorbato é encontrado no organismo em compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos por apresentar solubilidade em água, e na peroxidação lipídica pode atuar de duas maneiras: no plasma sanguíneo por meio da reação com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio presentes, ou na

restauração ao doar hidrogênio ao radical lipídico (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As enzimas catalase, peroxidase e superóxido dismutase, tiveram suas atividades influenciadas pela substância **(3)** e pela FDCM (Tabela 21). A FDCM influenciou a atividade da peroxidase semelhantemente ao ácido ascórbico, e a substância **(3)** influenciou a atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase semelhantemente ao acetato de tocoferol e da superóxido dismutase ao ácido ascórbico.

TABELA 21 – ATIVIDADE DE AMOSTRAS DE *G. vellosii* SOBRE AS ENZIMAS CATALASE, PEROXIDASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE

AMOSTRA	CATALASE (U)	PEROXIDASE ($\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$)	SUPERÓXIDO DISMUTASE (% de inibição)
Acetato de Tocoferol	2,250 \pm 0,090 a	4,460 \pm 0,092 a	49,733 \pm 4,050 a
Ácido Ascórbico	1,661 \pm 0,035 b	1,723 \pm 0,410 b	47,267 \pm 0,802 a
FDCM	0,151 \pm 0,044 c	2,483 \pm 0,233 b	32,433 \pm 2,363 b
Substância (3)	2,510 \pm 0,322 a	4,353 \pm 0,427 a	44,933 \pm 2,380 a

NOTAS: (1) FDCM = fração diclorometano e **(3)** = substância isolada.

(2) Médias seguidas com a mesma letra **na mesma coluna** não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade antioxidante pela FDCM era esperada por apresentar em sua composição sesamina e lupeol, que possuem atividade antioxidante (NONAKA *et al.*, 1997; CHATURVEDI; BHUI; SHUKLA, 2008; CHUNG *et al.*, 2010) e aspidospermina, um alcalóide indólico, que apresentou atividade antioxidante neste trabalho.

A atividade antioxidante de alcaloides foi relatada por Akindele *et al.* (2010) que cita os alcaloides como antioxidantes naturais. Larson (1988) cita os alcalóides indólicos estricnina e brucina com atividade antioxidante, provavelmente por inativação de oxigênio singlete. Ainda, a propriedade antioxidante de derivados indólicos com metoxi substituição, deve-se provavelmente a essa substituição, como no carvedilol (STOLC, 1999; DULIN; ABRAHAM, 2004).

A doença de Alzheimer, conhecida por causar progressiva degeneração cerebral (LIMA *et al.*, 2009a), pode estar relacionada ao estresse oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007). A substância galantamina hidrobromida foi testada

sobre a doença de Alzheimer e verificou-se que suas propriedades antioxidantes *in vitro* podem contribuir para os efeitos terapêuticos verificados (TRAYKOVA *et al.*, 2003). Lima *et al.* (2009a) verificou que a fração clorofórmio de *G. vellosii* possui potente atividade anticolinesterásica, ou seja, possui propriedade semelhante aos medicamentos utilizados no tratamento da doença de Alzheimer. Verifica-se, portanto, que a espécie *G. vellosii* além de possuir atividade anticolinesterásica, possui também atividade antioxidante para a fração diclorometano e para a substância **(3)** identificada como aspidospermina.

Substâncias que combatam os radicais livres podem ser utilizadas em doenças que tenham como causa a ação destes radicais, como o vitiligo, onde uma das possíveis causas é o acúmulo de substâncias oxidativas na epiderme (STEINER *et al.*, 2004). Em pacientes com vitiligo observou-se baixo nível de catalase na epiderme sã e lesada, sugerindo maior estresse originado pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio epidérmico (STEINER *et al.*, 2004).

4.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada da ordem Anostraca, de fácil manipulação e baixo custo (LIMA *et al.*, 2009b). Serve como alimento vivo para peixes e facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários e pode ser utilizado para estimar a toxicidade por meio da dose letal média (DL₅₀) (MEYER *et al.*, 1982).

O ensaio de toxicidade frente a *A. salina* é um ensaio biológico rápido, de baixo custo (MEYER *et al.*, 1982; SIQUEIRA *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2008), simples (SIQUEIRA *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2008) utilizado em análise preliminar de toxicidade geral (CAVALCANTE *et al.*, 2000; PARRA *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2008), para correlacionar com ação gastroprotetora (PARRA *et al.*, 2001), e com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana,

parasitocida (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SIQUEIRA *et al.*, 2001), tripanocida (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SIQUEIRA *et al.*, 2001; CLAUDINO *et al.*, 2009) e antitumoral (SIQUEIRA *et al.*, 2001; CLAUDINO *et al.*, 2009).

Segundo Meyer *et al.* (1982), as amostras são consideradas ativas quando a DL_{50} for menor que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, portanto, os resultados apresentados pela Tabela 22 demonstram que todas as amostras testadas apresentaram bioatividade sobre *A. salina*. O extrato etanólico e a fração butanol apresentaram intervalos de confiança com grandes variações, sendo de 66,05 a $2399,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de 28,13 a $765,90 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para o extrato etanólico o intervalo de confiança ultrapassou $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que pode ser indicativo de atividade negativa.

A amostra F12 apresentou uma DL_{50} de $29,48 \mu\text{g mL}^{-1}$, superando o resultado das outras amostras e dos controles sulfato de quinidina e dicromato de potássio (Tabela 22). Resultados positivos são indicativos de citotoxicidade (SANABRIA-GALINDO; LÓPEZ; GUALDRÓN, 1997; PETEROS; UY, 2010) e como a sesamina possui citotoxicidade (HORI *et al.*, 2011), e a F12 possui esta lignana, pode-se supor que este resultado ocorreu pela presença desta substância ou pelo sinergismo com as outras presentes.

A substância **(3)**, identificada como aspidospermina apresentou uma DL_{50} de $232,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 22). A toxicidade de alcaloides isolados de espécie da família Apocynaceae sobre *A. salina* foi relatada por Ferreira *et al.* (2006) os quais verificaram a bioatividade de cilindrocarpidina e homocilindrocarpidina isolados das raízes de *Aspidosperma polyneuron*.

TABELA 22 – BIOATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE *G. vellosii* NO ENSAIO COM *A. salina*

Amostra	$DL_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	Intervalo de confiança de 95% ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Extrato Etanólico	398,11	66,05 – 2399,68
Fração Diclorometano	251,19	195,18 – 323,25
Fração Acetato de Etila	173,65	93,37 – 322,94
Fração Butanol	146,70	28,13 – 765,90
Fração Hidroalcoólica	439,40	240,28 – 803,53
F12	29,48	21,51 – 37,71
Substância (3)	232,63	174,80 – 309,59
Sulfato de Quinidina	50,12	35,80 – 70,16
Dicromato de Potássio	20-40*	-

*MOREIRA *et al.* (2003).

4.7 ATIVIDADE SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

O neutrófilo em repouso apresenta o sistema das enzimas oxidases dependentes da NADPH inativo. Este sistema ao ser ativado permite a redução do oxigênio em superóxido com liberação de íons de hidrogênio e queda do pH intracelular. O peróxido de hidrogênio é formado com o encontro de dois radicais superóxido, e o peróxido de hidrogênio em presença de pH ácido gera oxigênio singlete (LORENZI, 2006). Esta produção de radicais ativos de oxigênio (EROs), os quais são citotóxicos (ROITT; BRUSTOFF; MALE, 1992), pode ser visualizada por meio da redução do azul *p*-Nitrotetrazólio (NBT) na presença dos radicais, formando um produto de coloração azul, denominado formazan (FORTE *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2010). O formazan deposita-se no citoplasma do neutrófilo (FORTE *et al.*, 1999), e pode ser visualizado nas amostras que apresentaram ativação positiva.

O resultado deste ensaio foi apresentado conforme a Tabela 23, em ativação positiva ou negativa.

TABELA 23 – ATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE *G. vellosii* SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

AMOSTRA	CONTROLES			CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	SNBT	CNBT	PMA ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$)	2,5	5,0	10,0	15,0
F12	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Substância (2)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Substância (3)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
F14	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

NOTA: SNBT = sem NBT; CNBT = com NBT; (-) = ativação negativa; (+) = ativação positiva.

Para avaliação dessa atividade, para cada amostra foram realizados cinco ensaios para verificar a ativação dos neutrófilos. A amostra F12 não ativou os neutrófilos o que pode ser decorrente da mistura de compostos. As substâncias (2), (3) e a amostra F14 ativaram os neutrófilos humanos nas concentrações testadas, 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, semelhantemente ao controle positivo PMA com 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 23 e Figuras 41 a 43).

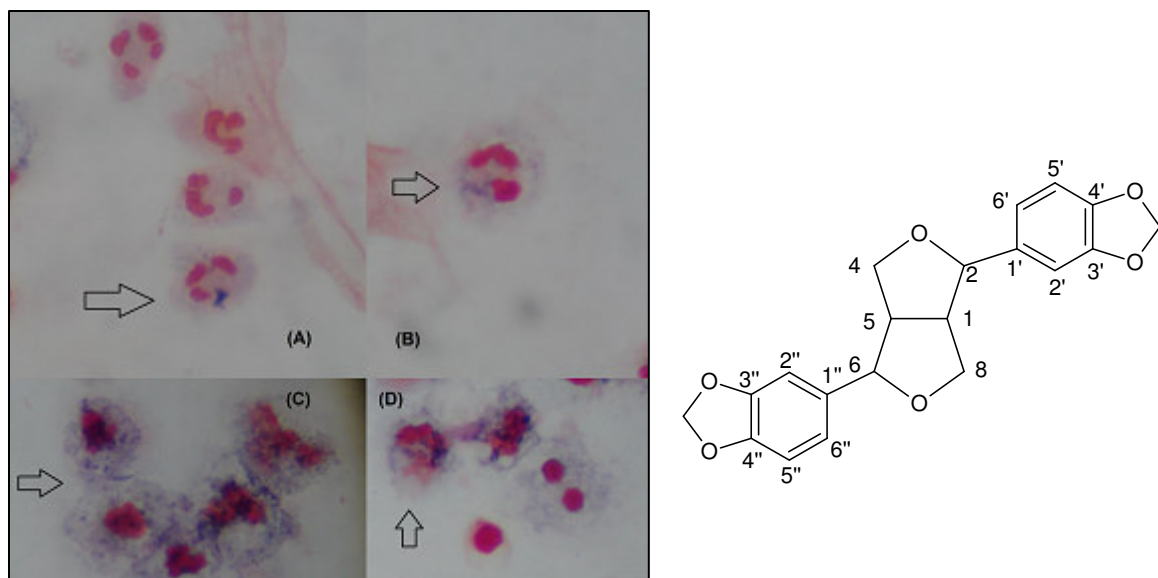


FIGURA 41 – NEUTRÓFILOS ATIVADOS COM 2,5 (A) – 5,0 (B) – 10,0 (C)
E 15,0 (D) $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE SUBSTÂNCIA (2)
FONTE: A AUTORA (2010)

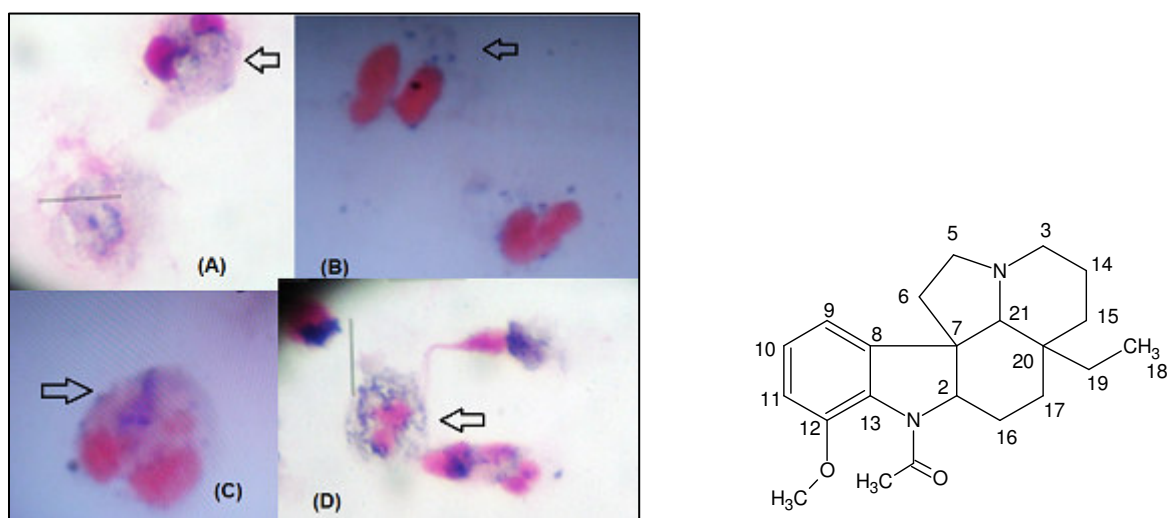


FIGURA 42– NEUTRÓFILOS ATIVADOS COM 2,5 (A) – 5,0 (B) – 10,0 (C)
E 15,0 (D) $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE SUBSTÂNCIA (3)
FONTE: A AUTORA (2010)

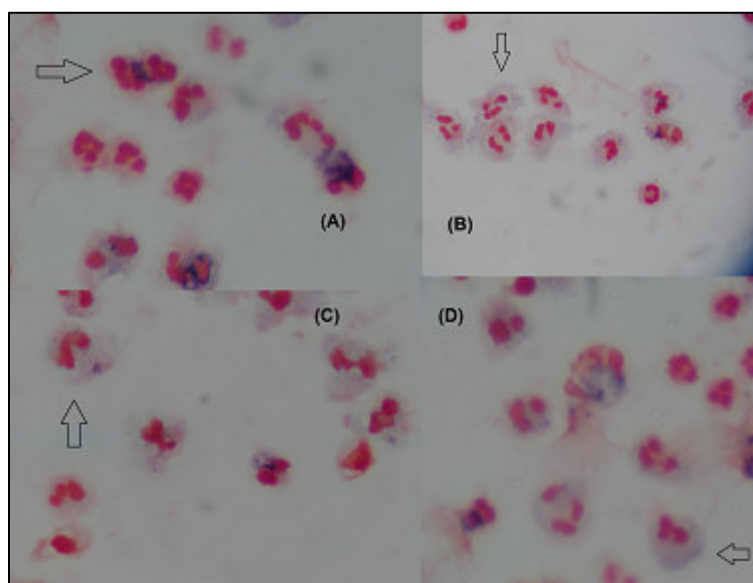


FIGURA 43 – NEUTRÓFILOS ATIVADOS COM 2,5 (A) – 5,0 (B) – 10,0 (C)
E 15,0 (D) $\mu\text{g mL}^{-1}$ DE F14
FONTE: A AUTORA (2010)

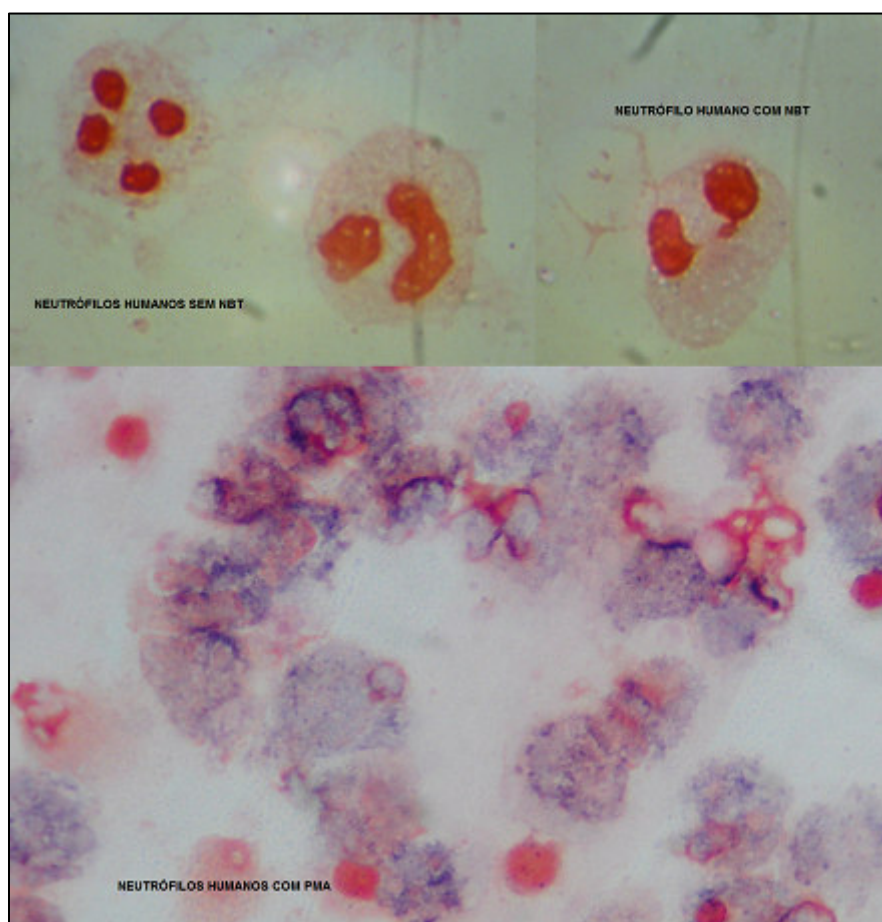


FIGURA 44 – CONTROLES DA ATIVIDADE SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS
FONTE: A AUTORA (2010)

As setas indicativas nas Figuras 41 a 43 mostram a formação dos grânulos azuis formados pela redução do NBT e a Figura 44 representa os controles utilizados no ensaio.

Chen *et al.* (2011) verificou que a sesamina inibe a geração de ânion superóxido por neutrófilos humanos em resposta ao agente estimulante *N-formyl-methionil-leucil-phenilalanina* (FMLP). Esta diferença de resultados pode ser decorrente da técnica empregada.

Neste ensaio, o PMA (*phorbol myristate acetate*), um éster de forbol conhecido também como TPA (*O-tetradeconoilforbol-13-acetato*), foi utilizado como controle positivo por estimular neutrófilos, e esta substância também ativa a PKC (proteína quinase C) (LIMASSET *et al.*, 1993; HUANG; NGUYEN; PICKETT, 2000). O aumento das enzimas superóxido dismutase, glutational peroxidase ou redutase e catalase, e de suas atividades, pode ser devido a um mecanismo regulado em nível transcricional. Quando aumenta a produção de EROs, o fator Nrf2 fica ativado, e o mesmo é transportado para o núcleo e ligado a elementos de resposta a antioxidantes (ARE), na região promotora dos genes que transcrevem enzimas antioxidantes. Esta ativação Nrf2-ARE induz a produção de enzimas antioxidantes (SILVA *et al.*, 2011). Portanto, a resposta celular ao estresse oxidativo ocorre em parte pela ARE (HUANG; NGUYEN; PICKETT, 2000). Huang, Nguyen e Pickett (2000) citam que o PMA possui propriedade semelhante ao antioxidante t-BHQ (terc-butil-hidroquinona) e que a ativação da ARE requer pelo menos em parte ativação da PKC.

As amostras **(2)** e **(3)**, identificadas como **(+)-sesamina** e **(+)-aspidospermina**, respectivamente, apresentam propriedade antioxidante, e também de ativação de neutrófilos humanos para liberação de complexos reativos de oxigênio, semelhantemente ao PMA. Nesta perspectiva, pode-se supor que as mesmas também podem ativar a PKC e, portanto, ativar a ARE.

Algumas substâncias, como o ascorbato, α -tocoferol, o ácido indol-3-

acético e o ácido cafeico, podem atuar como antioxidante e pró-oxidante (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006). Para o α -tocoferol, a atividade dependerá do sistema testado, da concentração, do método utilizado para acompanhar a oxidação e do tempo de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

Substâncias que estimulam os neutrófilos a liberarem radicais ativos de oxigênio, ou seja, imunomoduladoras, podem ser estudadas para a utilização em doenças que apresentam defeito funcional desses fagócitos, como por exemplo, a doença granulomatosa crônica. Ou, em outras doenças como parasitárias e bacterianas, onde a ativação dos neutrófilos para liberação de espécies reativas de oxigênio seja necessária.

5 CONCLUSÕES

O extrato etanólico obtido a partir das cascas de *G. vellosii* foi fracionado com solventes de polaridade crescente obtendo-se a fração diclorometano (FDCM), acetato de etila (FAE), butanol (FB) e hidroalcoólica (FHA).

A FDCM foi submetida à cromatografia em coluna e primeiramente quatro constituintes foram isolados. Destes, dois apresentaram-se puros, denominados **(1)** e **(3)**. Os outros dois constituintes apresentaram-se impuros e foram denominados F12 e F14. A amostra F12 foi purificada por meio de CLAE semi-preparativa e a substância **(2)** foi obtida.

A substância **(1)** foi identificada como **lupeol**, a **(2)** como (+)-**sesamina** e a **(3)** como (+)-**aspidospermina**. A amostra impura F14 foi identificada como a mistura de **sesamina** e **aspidospermina**.

As amostras testadas nos ensaios alelopáticos apresentaram atividade sobre as duas espécies-alvo caracterizando potencial fitotóxico em mono e dicotiledôneas na fase pré e pós-crescimento com incapacidade de recuperação. A substância **(1)** apresentou atividade alelopática inibindo o crescimento da radícula e do hipocótilo da *L. sativa* no ensaio alelopatográfico. A substância **(3)** e a mistura F12 influenciaram o crescimento da *Lactuca sativa* no ensaio alelopatográfico e alelopático por meio de caixa de poliestireno. A FDCM e FB apresentaram o maior potencial fitotóxico pelo ensaio alelopático por meio de placa de Petri. A fitotoxidade da FDCM provavelmente deve-se a presença das substâncias **(1)**, F12 e **(3)**.

No ensaio utilizando disco difusão não foi verificada a inibição do crescimento das bactérias testadas, provavelmente devido a características lipofílicas das amostras de *G. vellosii*.

No ensaio bioautográfico a FDCM inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. typhimurium*, e a substância **(3)** inibiu o crescimento de *S. epidermidis* e *S. typhimurium*.

No ensaio de microdiluição verificou-se que 1000 µg mL⁻¹ de EB e 200 µg

mL⁻¹ de FB inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

No ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio a substância **(3)** apresentou uma capacidade antioxidante superior a rutina, porém inferior ao ácido ascórbico.

No ensaio antioxidante pelo método do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas, a substância **(3)** apresentou atividade antioxidante semelhante ao BHT na concentração de 1000 e 100 ppm, e ao ácido ascórbico na concentração de 500 e 100 ppm.

Na verificação do potencial antioxidante pela atividade da catalase, peroxidase e superóxido dismutase, as enzimas tiveram suas atividades influenciadas pela substância **(3)** e pela FDCM. A FDCM influenciou a atividade da peroxidase semelhantemente ao ácido ascórbico, e a substância **(3)** influenciou a atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase e catalase semelhantemente ao acetato de tocoferol e da superóxido dismutase ao ácido ascórbico.

Sobre a *A. salina*, todas as amostras testadas apresentaram bioatividade, com resultados menores que 1000 µg mL⁻¹, indicativo de toxicidade. A amostra F12 apresentou atividade superior aos controles sulfato de quinidina e dicromato de potássio e este resultado pode ter ocorrido devido à presença da lignana sesamina na amostra F12, a qual possui citotoxicidade.

As substâncias **(2)** e **(3)**, e a mistura **F14** apresentaram-se como ativadoras dos neutrófilos humanos, ou seja, imunomoduladoras.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As substâncias isoladas da FDCM oriunda das cascas de *G. vellosii* não são inéditas, porém o isolamento destas nesta espécie até o presente momento não havia sido relatado.

Pelos ensaios realizados neste trabalho, o extrato etanólico e a fração butanol apresentaram-se fitotóxicos, antibacterianos e tóxicos frente à *A. salina*. As frações acetato de etila e hidroalcoólica remanescente apresentaram-se fitotóxicas e tóxicas para *A. salina*. A fração diclorometano apresentou-se antibacteriana, fitotóxica, antioxidante e tóxica para *A. salina*. O lupeol apresentou-se fitotóxico, a mistura F12 fitotóxica e tóxica para *A. salina*, e a sesamina e a mistura F14, imunomoduladoras. A aspidospermina apresentou-se fitotóxica, antibacteriana, antioxidante, tóxica para *A. salina* e imunomoduladora.

Os resultados apresentados neste trabalho pelas amostras de *G. vellosii* na verificação da atividade alelopática, antibacteriana, antioxidante, sobre *Artemia salina* e sobre neutrófilos humanos, demonstram o potencial da espécie em influenciar sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J.S. *et al.* Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009.
- ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 1., p. 21-25, 2003.
- AKINDELE, A.J. *et al.* Hepatoprotective and *in vivo* antioxidant effects of *Bysocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 46-52, 2010.
- ALMEIDA, G.D. *et al.* Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín**, v. 61, n. 1, p. 4237-4247, 2008.
- ALMEIDA, M.R. *et al.* Pereirina: o primeiro alcalóide isolado no Brasil? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 942-952, 2009.
- ALPER, G. *et al.* The effects os vitamin A on catalase activies in various rat tissues. **Jounal of Medical Sciences**, v. 28, p. 127-131, 1998.
- ALVES, C.Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2201-2210, 2010.
- ALVES, L.L. *et al.* Atividade alelopática de extratos aquosos de plantas medicinais na germinação de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 328-336, 2011.
- ARATANECHMUGE, Y. *et al.* Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumen (*Gossampinus malabarica* L. Merr) in human promyelotic leukemia HL-60cells. **Oncology Reports**, v. 11, p. 289-292, 2004.
- ARAÚJO JR, J.X. de *et al.* Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 183-188, 2007.
- ARNDT, R.R. *et al.* Alkaloid studies – LVIII. **Phytochemistry**, v. 6, p. 1653-1658, 1967.
- ARNON, D.I. Copper and enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.
- AUROSSEAU, M.M. Etude pharmacodynamique de la geissospermine alcaloide principal du *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 19, n .2, p. 104-116, 1960.
- AUROSSEAU, M.M. Etude pharmacodynamique de la geissospermine alcaloide principal du *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon (Apocynacées). **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 19, n. 3, p. 175-189, 1961.
- AYRES, M.C.C *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BARBOSA, W.L.R.; TAVARES, I.C.C.; SOARES, D.C. Alcalóide de *Aspidosperma auriculatum* Standl. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 06-08, 2003.

BARBOSA-FILHO, J.M. *et al.* Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 109-139, 2006.

BARNES, J.P. *et al.* Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26 n. 5, p.1385-1390, 1987.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-125, 2006.

BARROS, J.S. *et al.* A captação de serotonina por alcalóides de *Geissospermum laeve* Vell.Baill. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. **Anais do XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Salvador, 2006.

BELJANSKI, M.; BELJANSKI, M.S. Selective inhibition of in vitro synthesis of cancer DNA by alkaloids of β -carboline class. **Pathobiology**, v.50, n.2, p. 79-87, 1982.

BELJANSKI, MIRKO. **Antiviral preparations**. PCT/FR93/00761. U.S. n. 5,519,028.26 July 1993. 22 February 1994.

BELJANSKI, M. The anticancer agent PB-100, selectively active on malignant cells, inhibits multiplication of sixteen malignant cells lines, even multidrug resistant. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n. 1, p. 29-33, 2000.

BERTANI, S. *et al.* Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p. 45-54, 2005.

BISWAS, J.C. *et al.* Rhizobial inoculation influences seedling vigot and yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 880-886, 2000.

BOGATEK, R.; GNIAZDOWSKA, A. ROS and phytohormones in plant-plant allelopathic interaction. **Plant Signaling & Behavior**, v.2, n.4, p.317-318, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid e sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a análise de sementes**, Brasília: SNDA/DNDU/CLU, 1992.

BRAVO, H. R. *et al.* Phytotoxicity of índole alkaloids from cereals. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 38, n. 2, p. 123-129, 2010.

CAMARGO, M.L.P. *et al.* Atividade enzimática em plântulas de *Eucalyptus grandis* provenientes de sementes envelhecidas artificialmente e naturalmente. **Ciência Florestal**, v.10, n. 2, p. 113-122, 2000.

CAMPBELL, W.E.; JACKSON, G.E.; RAVENSCROFT, N. Two dimensional NMR study of aspidospermine. **Spectroscopy Letters**, v. 26, n. 4, p. 707-719, 1993.

CAMPOS, A.D. *et al.* Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Revista de Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 7, p. 637-643, 2004.

CARMO, F.M.S.; BORGES, E.E.L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 697-705, 2007.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 97-101, 127.

CARVALHO, M.G. *et al.* Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 556-559, 2001.

CARVALHO, A.A.T. *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.

CARVALHO, J.L.S. *et al.* Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031-1035, 2009.

CAVALCANTE, M.F. *et al.* Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p.20-22, 2000.

CAYON, D.G. *et al.* Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, p. 33-40, 1990.

CHATURVEDI, P.K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, p. 1-13, 2008.

CHATURVEDULA, V.S.P. *et al.* Two new triterpene esters from the twigs of *Brachylaena ramiflora* from the Madagascar rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1222-1224, 2002.

CHEN, J-J. *et al.* New benzenoids and anti-inflammatory constituents from *Zanthoxylum nitidum*. **Food Chemistry**, v. 125, p. 282-287, 2011.

CHIARONI, P.A.; RICHE, C. Structure et stéréochimie d'alcaloïdes indoliques. Structure de la geissospermine. **Acta Crystallographica**, v. 35, p. 1820-1825, 1979.

CHUNG, B-H. *et al.* Angiogenic activity of sesamin through the activation of multiple signal pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, p. 254-260, 2010.

CLAUDINO, G.P. *et al.* Chemical constituents and lethality of *Paullinia weinmanniaefolia* (Sapindaceae) against *Artemia salina* Leach. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.1A, p.26-28, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Eight edition. M7-A8, 2009.

CÓRDOVA, A.; NAVAS, F.J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v.6, n.5, p. 204-208, 2000.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1974.

COSTA, P. H. A. *et al.* Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, n. 4, p. 353-361, 2005.

CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A; SERUR, L.M. Alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry**, v.22, n.6, p.1526-1528, 1983.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of floring plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRUZ-ORTEGA, R.; LARA-NÚÑEZ, A.; ANAYA, A.L. Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.2, n.4, p.269-270, 2007.

DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 9, p. 2079-2093, 2000.

DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SENATORE F. Pottential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v.61, n. 5, p.573-578, 2002.

DIAS, J.F.G. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Willd.** Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DIAS, J.F.G. *et al.* Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.220-223, 2005.

DIETZ, H.; WINTERHALTER, P. Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves. **Phytochemistry**, v.42, n.4, p.1005-1010, 1996.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Editora UNESP, 2 ed., 2002.

DULIN, B.; ABRAHAM, W.T. Pharmacology of carvedilol. **The American Journal of Cardiology**, v. 93, n. 9A, p. 3B-6B, 2004.

FACUNDO, V.A. *et al.* Constituintes químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 224-225, 2005.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR)**. Pacote computacional. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, A.G., AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, I.C.P. *et al.* Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FERREIRA, D.T. *et al.* Alcalóides indólicos e o éster dioctil do ácido adípico isolados de *Aspidosperma polyneuron*, Apocynaceae. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

FERREIRA, M.S.L. *et al.* Efeito de metabólito de triptofano sobre a capacidade fagocitária em neutrófilos de ratos. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 65-70, 2006.

FIGUEIREDO, E.R. *et al.* Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcalóides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmanii* (A. DC.), Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 675-681, 2010.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1956.

FORTE, W.C.N. *et al.* Avaliação de neutrófilos na desnutrição moderada. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.45, n.2, p.147-151, 1999.

FRANÇA, V.C. *et al.* Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.4, p. 326-330, 2005

FUMAGALI, E. *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FÜRSTNER, A.; ERNST, A. Syntheses of camalexin, indolopyridocoline and flavopereirine. **Tetrahedron**, v.51, n.3, p773-786, 1995.

GALARRETA, B. *et al.* The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 6689-6695, 2008.

GATTI, A.B. **Atividade alelopática de espécies do cerrado**. São Carlos, 2008. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos.

GEISSOSPERMUM. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/project/>>. Acesso em 16 de abril de 2007.

GILANI, S.A. *et al.* Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies of *Rhazya stricta* Decne. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 301-307, 2007.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3, p. 395-407, 2005.

GUIMARÃES, H.A.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.J.C. ¹H and ¹³C-NMR data of the simplest plumeran indole alkaloids isolated from *Aspidosperma* species. **Molecules**, v. 17, p. 3025-3043, 2012.

HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; POHLIT, A.M. Alcalóides indólicos de cascas de *Aspidosperma Vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

HOFFMANN, C.E.F. *et al.* Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 6, n. 1, p. 11-21, 2007.

HORI, H. *et al.* Genotoxicity evaluation of sesamin and episesamin. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 719, p. 21-28, 2011.

HUANG, H-C; NGUYEN, T.; PICKETT, C.B. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12475-12480, 2000.

HUGHES, N.A.; RAPOPORT, H. Flavopereirina, an alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **Journal American of Chemical Society**, n. 80, v.7, p. 1604-1609, 1958.

INDEX KEWENSIS. Oxford University Press, 1895, p.179.

INDEX KEWENSIS. Oxford University Press, 1913, p.95.

JÀCOME, R.L.R.P. *et al.* Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("Pau pereira"). **Química Nova**, v.27, n.6, p. 897-900, 2004.

JAYASINGHE, L. *et al.* Antigungal constituents of the bark of *Bridelia retusa*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 637-641, 2003.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. New York: Freeman, 1962.

JOLY, A.B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 12ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p. 560-566.

KATO, L. *et al.* Indole alkaloids from *Rauvolfia bahiensis* A.DC. (Apocynaceae). **Phytochemistry**, v.60, p.315-320, 2002.

KISHIDA, E. *et al.* Re-evaluation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances as indices of autoxidation based on oxygen consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.1, p.1-4, 1993.

KISO, Y. *et al.* Sesamin ingestion regulates the transcription levels of hepatic metabolizing enzymes for alcohol and lipids in rats. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 29, n. 11, p. 116S-120S, 2005.

KOCH, I.; RAPINI, A. **Apocynaceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB004606>>. Acesso em 01 de junho de 2012.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 2 ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1993.p.458-479.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Secretaria geral da organização dos Estados Americanos. Washington D.C, Estados Unidos. 1983. 174p.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LEVINSKY, R. J. *et al.* Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v.54, p.595-598, 1983.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LIMA, J.A. *et al.* *Geissospermum vellosii* stem bark anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.92, p.508-513, 2009a.

LIMA, J.M. *et al.* Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, v.27, n.1, p.7-11, 2009b.

LIMASSET, B. *et al.* Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, n. 7, p. 1257-1271, 1993.

LIU, D.L.; LOVETT, J.V. Biologically active secondary metabolites of barley. Phytotoxicity of barley allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.10, p.2231-2244, 1993.

LORENZI, T.F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LUZ, S. M. *et al.* Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, 2010.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962

MALHEIROS, A .; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MANSKE, R.H.F.; HOLMES, H.L. **The alkaloids: chemistry and physiology**. New York: Academic Press Inc, 1952. p. 369-481.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, n. 1, p. 61-69, 2006.

MARKERT, M.; ANDREWS, P.C.; BABIOR, B.M. Measurement of O_2^- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 358-365, 1984.

MEDEIROS, W.L.B. *et al.* A new natural quaternary indole alkaloid isolated from *Tabernaemontana laeta* Mart. (Apocynaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.12, n.3., p.368-372, 2001.

MENZIES J.R.W. *et al.* Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). **European Journal of Pharmacology**, v.350, p.101-108, 1998.

MEYER, B.N. *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Editorial Robe, 1999. 115 p.

MITAINE, A.C. *et al.* Alkaloids from *Aspidosperma* species from Bolivia. **Planta Medica**, n.62, p. 458-461, 1996.

MITAINE, A.C. *et al.* Indole alkaloids from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. **Planta Medica**, v. 64, p. 487, 1998.

MOORE, R.E.; RAPOPORT, H. Geissovelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Organic Chemistry**, v.38, n.2, 215-230, 1973.

MORAIS, S.M. de M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n.5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, F.P.M. *et al.*, Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v.26, n.3, p.309-311, 2003.

MUKHOPADHYAY, S. *et al.* Anticancer indole alkaloids of *Rhazya stricta*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 6, p. 696-700, 1981.

MUÑOZ, V. *et al.* A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p.127-137, 2000.

NASCIMENTO, I.R. *et al.* Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatilis* larvae. **Pest Management Science**, v. 60, p. 413-416, 2003.

NASCIMENTO, J.E. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach., de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 143-148, 2008.

NEVES, L.A.S.; MORAES, D.M. Análise do vigor e da atividade da α -amilase em sementes de cultivares de arroz submetidas a diferentes tratamentos com ácido acético. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 4, n. 1, p. 35-43, 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NONAKA, M. *et al.* Effects of dietary sesaminol and sesamin on eicosanoid production and immunoglobulin level in rats given ethanol. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 5, p. 836-839, 1997.

NOVO, M.C.S.S. *et al.* Efeitos de extratos aquosos de estruturas de grama-seda no desenvolvimento inicial de plântulas de arroz, milho e trigo. **Bragantia**, v. 68, n. 3, p. 665-672, 2009.

OLIVEIRA, A. J. B. **Estudo de seis espécies do gênero *Aspidosperma* utilizando GC, GC/MS e HPLC: análise qualitativa e quantitativa. Teste bioautográfico;**

cultura de tecidos e células vegetais e rota de preparação dos compostos diméricos ramiflorina A e ramiflorina B. Campinas, 1999. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

OLIVEROS-BASTIDAS, A. de J. *et al.* Exudados de la raíz y su relevancia actual em las interacciones alelopáticas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 198-213, 2009.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E. de; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PACCIONI J-P; HUSSON, H-P. Alcaloides de *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). **Phytochemistry**, v.17, n.12, p.2146-2147, 1978.

PARIS, MM. R.; POINTET, M. Sur une Apocynacée fébrifuge de Guyane, le “Maria-Congo”, (*Geissospermum sericeum* Benth. et Hook). **Annales Pharmaceutiques Françaises**, p. 547-555, 1954.

PARK, B.H.; FIKRIG, S.M.; SMITHWICK, E.M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. **The Lancet**, p. 532-534, 1968.

PARK, B.H.; GOOD, R.A. N.B.T. test stimulated. **The Lancet**, p. 616, 1970.

PARRA, A.L. *et al.* Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p.395-400, 2001.

PEREIRA, M. de M. *et al.* Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v.30, n.4, p.1-14, 2007.

PERGO, E.M.; ISHII-IWAMOTO, E. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 500-513, 2011.

PETEROS, N.P.; UY, M.M. Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of four Philippine medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.5, p.407-414, 2010.

PIETRZYCKA, A. *et al.* Effect of vita glucan on some antioxidant parameters of the human blood. *in vitro* study. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 63, n. 6 p. 547- 551, 2006.

PINHEIRO, M.L.B. *et al.* Lignanas de *Strychnos guianensis* (AUBLET) MART. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 188-192, 2004.

PIRES, N.M. *et al.* Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PUISIEUX, F. *et al.* Sur les alcaloïdes du “pao-pereira” *Geissospermum laeve* (Vellozo) Baillon. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.17, p.626-633, 1959.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RANA K.K.; GUIN, C.; ROY, S.C. A short and stereoselective total synthesis of (\pm) sesamin by radical cyclisation of an epoxide using a transition-metal radical source. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 9337-9338, 2000.

RAPOPORT, H. *et al.* Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. **Journal of the American Society**, v. 80, n. 7, p. 1601-1604, 1958.

RAPOPORT, H.; MOORE, R.E. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. Isolation and structures determinations of vellosimine, vellosiminol and geissolosimine. **The Journal of Organic Chemistry**, v.27, n.9, p. 2981-2985, 1962.

RAPUSSI, M.C.C. *et al.* Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest 'Valencia' oranges. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 513-521, 2009.

RATES, S.M.K. *et al.* Alcalóides indólicos em *Peschiera australis* (Muell. Arg.) Miers. Var. *australis*. **Caderno de Farmácia**, v.4, n.1/2, p.51-62, 1988.

REIS, F.A.M. *et al.* Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 963-967, 1996.

RÍOS, J.L.; GINER, R.M.; PRIETO, J.M. New finding on the bioactivity of lignans. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 26, parte G, p. 183-292, 2002.

ROITT, I.M.; BRUSTOFF, J.; MALE, D.K. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1992.

ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.

SANABRIA-GALINDO, A.; LÓPEZ, S.I.; GUALDRÓN, R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacéuticas**, n.26, p.15-19, 1997.

SILVA, C.V. *et al.* Alcaloides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. ST. HIL. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2052-2055, 2008.

SILVA, C.B. **Avaliação do potencial de atividade alelopática da parte aérea e subterrânea de *Hydrocotyle bonariensis* LAM. (ARALIACEAE)**. Campo Grande, 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

SILVA, M. *et al.* Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 1, p. 46-53, 2011.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis: Editora da UFSC e Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2000.

SIMONSEN, H.T. *et al.* Antifungal constituents of *Melicope borbonica*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 542-545, 2004.

SINGH, H.P. *et al.* α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annals of Botany**, v.98, n.6, p.1261-1269, 2006.

SIQUEIRA, J.M.D. *et al.* Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanni* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SIQUEIRA, J.M. *et al.* Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P.P. Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro comum à Murcha-de-Curtobacterium. **Fisiopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 373-377, 2004.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

SOMEL, M.; YAMADA, F. Simple indole alkaloids and those with a nonrearranged monoterpenic unit. **Natural Product Reports**, v.21, p.278-311, 2004.

STATISTICAL ANALYSIS SOFTWARE. Disponível em: <<http://www.scientific-solutions.ch/download/demo/sigmastat/sigmastat.html>>. Acesso em: 20/03/11.

STEELE, J.C.P. *et al.* Indole and β -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **Journal of Natural Products**, v.65, p.85-88, 2002.

STEINER, D. *et al.* Vitiligo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n.3, p.335-351, 2004.

STEPONKUS, P.L.; LANPHEAR, F.O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, p.1423-26, 1967.

STOLC, S. Indole derivatives as neuroprotectants. **Life Sciences**, v. 65, n. 18/19, p. 1943-1950, 1999.

TALAPATRA, B.; PATRA, A.; TALAPATRA, S.K. Terpenoids and alkaloids of the leaves of *Tabernaemontana coronaria*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1652-1653, 1975.

TANAE, M.M. *et al.* Liberação da geissospermina, alcalóide isolado do pau-pereira (*Geissospermum vellosii*) no músculo esquelético. In: Reunião anual da FESBE, 14, 1999, Caxambú. **Anais da XIV Reunião anual da FESBE**. Caxambú, 1999, p. 387.

TANAE, M.M. *et al.* Interação de Geissospermina, alcalóide isolado do pau pereira (*Geissospermum laeve*), com receptores nicotínicos musculares. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 18, 2004, Manaus. **Livro de Resumos**. Manaus, 2004, p.431.

TANAKA, J.C.A. *et al.* Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.387-391, 2006.

TANAKA, J.C.A. *et al.* Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v.14, p.377-380, 2007.

TRAYKOVA, M. *et al.* Antioxidant properties of galantamine hydrobromide. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 361-365, 2003.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P. *et al.* Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 2, p. 149-151, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de documentos científicos**. v. 1-9, Curitiba: Editora UFPR, 2007.

VAN BEEK, T.A.; VERPOORTE, R. 16(S)-Hidroxy-16,22-dihydroapparicine, a new alkaloid from leaves of *Tabernaemontana dichotoma*. **Journal of Natural Products**, v.47, n.5, p.835-838, 1984.

VASCONCELOS, S.M.L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VIECELLI, C.A. *et al.* Resistance induction in bean plants against angular leaf spot by extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2010.

WALKER, T.M. *et al.* A phytochemical investigation of *Zanthoxylum setulosum*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 12, p. 1807-1808, 2011.

WERNER, J.A.T. *et al.* Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 163-169, 2009.

WILLADINO, L. *et al.* Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 417-422, 2011.

XAVIER DE ARAUJO, J. *et al.* Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 183-188, 2007.

ZERAIK, A.E. *et al.* Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZHU, W-M. *et al.* Components of stem barks of *Winchia calophylla* A. DC. And their bronchodilator activities. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 7, n. 892-896, 2005.

ZOCOLER, M.A. *et al.* Qualitative determination of indole alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6B, p.1372-1377, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1**APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA CEP/SD 603.140.08.8**

Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa



Curitiba, 22 de abril de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Josiane de Fátima Gaspari Dias

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Estudo químico dos alcalóides e seu efeito sobre a função dos neutrófilos humanos**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 27 de agosto de 2008 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 22 de abril de 2009.

Registro **CEP/SD**: 603.140.08.08 **CAAE**: 2596.0.000.091-08

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 22/10/2009.

Atenciosamente

Prof. Dr. Liliana Maria Labronci
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

*Prof. Dra. Liliana Maria Labronci
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SC/UFPR*

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP 80060-240
Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2**APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA CEP/SD 1033.158.10.11**

Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa



Curitiba, 01 de fevereiro de 2011

Ilmo (a) Sr. (a)
Obdulio Gomes Miguel
Josiane de Fátima Gaspari Dias

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Estudo de produtos naturais sobre a função dos neutrófilos humanos”** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 01 de dezembro de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 01 de fevereiro de 2011.

Registro CEP/SD: 1033.158.10.11

CAAE: 0090.0.091.000-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 01/08/2011.

Atenciosamente

Prof. Dr. Ida Cristina Gubert
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde